



Caracterização do microbioma de queijos tradicionais Portugueses com DOP

Margarida Raimundo Raposo Ruivo Baptista

Mestrado em Microbiologia Aplicada

Dissertação orientada por:
Doutora Teresa Maria Leitão Semedo Lemsaddek
Professora Doutora Lélia Mariana Marcão Chambel



Caracterização do microbioma de queijos tradicionais Portugueses com DOP

Margarida Raimundo Raposo Ruivo Baptista

2018

O trabalho apresentado nesta dissertação de mestrado foi realizado no Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal – Faculdade de Medicina Veterinária Universidade de Lisboa (CIISA-FMV) sob a orientação direta da Doutora Teresa Maria Leitão Semedo Lemsaddek (Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Departamento de Produção Animal e Segurança Alimentar Secção de Tecnologia dos Produtos Animais, Avenida da Universidade Técnica – Pólo da Ajuda 1300-477 Lisboa) no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Agradecimentos:

Em primeiro lugar, queria agradecer à Doutora Teresa Semedo Lemsaddek, por me ter acolhido no seu laboratório, por toda a ajuda, por todo o conhecimento que me transmitiu ao longo destes meses e pela paciência e apoio.

À minha orientadora interna, a Professora Doutora Lélia Mariana Marcão Chambel, agradeço a compreensão, o apoio, a paciência e o conhecimento partilhado.

Agradeço a todos aqueles que me ajudaram e apoiaram na FMV: Professor Doutor António Salvador Barreto, Professora Doutora Maria João Fraqueza, Engenheira Maria José Fernandes, Maria Helena Fernandes.

Um obrigado muito grande às colegas de trabalho Andreia Aires e Vanessa Félix, por toda a amizade, paciência, galhofa, boa disposição e ajuda no trabalho, em especial à Andreia por todas as aventuras, pela paciência enorme e por todos os momentos inesquecíveis.

À Andreia Duarte, Marta Mota, Sofia Rato, Alexandra e Carolina Boinas, agradeço a amizade, o apoio e a compreensão em todas as fases e um obrigado muito grande ao Gonçalo por me ter apoiado principalmente na fase final, por me ter elevado a confiança e por estar sempre disponível para ouvir os meus stresses.

Queria agradecer aos meus pais, irmão e goldinho pelo apoio contante e pela compreensão pela minha ausência e cansaço e por me ajudarem a acreditar que eu conseguiria acabar esta etapa com êxito. Um obrigado muito grande à restante família, por compreenderem o facto de eu não estar presente em certos momentos familiares e por todo o apoio que demonstraram.

Resumo

Em Portugal são fabricados e comercializados uma vasta gama de queijos tradicionais de elevada riqueza e especificidade, muitos dos quais com Denominação de Origem Protegida (DOP). Estes queijos são ricos em microrganismos e necessitam destes durante o seu fabrico e maturação, o que lhes permite adquirir propriedades sensoriais específicas e características de cada produto e/ou região. O presente estudo analisou queijos tradicionais Portugueses com DOP de duas regiões Azeitão e Nisa que, apesar de serem produzidos em áreas distintas, apresentam semelhanças tais como o uso de leite de ovelha não pasteurizado e coalho vegetal (*Cynara cardunculus*) e, para tal, foram recolhidas amostras de cinco queijarias da região de Azeitão e duas da região de Nisa em três anos de produção (2016, 2017 e 2018).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi a caracterização do microbioma autóctone presente nas amostras de queijos Azeitão DOP e Nisa DOP, usando métodos de microbiologia convencional e molecular, incluindo uma abordagem metagenómica.

Inicialmente, procedeu-se à análise da diversidade dos perfis microbiológicos totais das diferentes amostras. Extraíu-se DNA das amostras recolhidas nas diferentes queijarias e anos de produção e procedeu-se à técnica de RAPD-PCR com os *primers* M13 e OPC15. Observou-se que cada amostra possuía um perfil próprio e que havia variações na comunidade microbiana das amostras da mesma queijaria recolhidas em anos diferentes. Posteriormente, de forma a identificar os géneros microbianos predominantes, realizou-se a técnica de sequenciação das regiões V1-V3 do gene 16S rRNA e foi visível que apesar da variedade genética de cada amostra o grupo de bactérias em maior abundância foram as bactérias ácido lácticas sendo os géneros predominantes *Lactococcus* e *Leuconostoc*.

De forma a caracterizar as bactérias ácido lácticas presentes nas amostras em análise procedeu-se ao isolamento em meios seletivos e diferenciação dos isolados utilizando as técnicas de RAPD-PCR com o *primer* OPC15 e eletroforese em campo pulsado com a endonuclease de restrição *Sma*I. Esta análise permitiu visualizar maior diversidade nos isolados do género *Lactococcus* em todas as amostras analisadas, comparativamente aos outros dois grupos e ainda que os perfis dos isolados apresentam variações em amostras da mesma queijaria mas de anos de produção distintos, com exceção de isolados do género *Enterococcus* onde foi visível em certas amostras a dominância de um perfil específico nos anos em estudo.

Em conclusão, os resultados deste estudo comprovaram que o microbioma destes queijos tradicionais portugueses é muito complexo e que cada amostra de queijo possui um microbioma autóctone característico e único com elevada relevância. Deste modo, será interessante uma caracterização mais detalhada destes microrganismos relativamente aos seus potenciais tecnológicos e patogénicos.

Palavras-chave:

Queijos tradicionais portugueses; Denominação de Origem Protegida; microbioma autóctone; bactérias ácido lácticas; análise da diversidade microbiana; análise metagenómica

Abstract

In Portugal, a wide range of traditional cheeses of high richness and specificity are manufactured carrying out the artisanal ways and without the use of starter cultures, many of them with Protected Designation of Origin (PDO). The autochthonous microbiome of these cheeses is responsible for the fermentation processes required during cheese manufacture and maturation and thus for the organoleptic characteristics of each product or region.

The present study analysed two Portuguese traditional PDO cheeses (Azeitão and Nisa), the samples were collected over a three years period (2016, 2017 and 2018) at seven dairies (five from Azeitão and two from Nisa). The aim of this study was characterizing the autochthonous microbiome present in the cheese's samples, using techniques of conventional and molecular microbiology, as well as a metagenomic approach (sequencing of the V1-V3 region of the 16S RNA).

Data from metagenomic approach allowed the identification of *Lactococcus* and *Leuconostoc* genus as the most abundant among cheese samples, despite region of origin and year of production. The results showed significant variations on the microbial diversity between dairies, regions and over time. Besides that, we could identify a wide range of lactic acid bacteria as being characteristic of specific dairies or regions. These bacteria belong mainly to the genus *Enterococcus* and we observed that remained constant over-time, suggesting that these bacteria have an important role in the manufacture of the samples under study.

In conclusion, results obtained prove that autochthone microbiome of traditional cheeses with PDO is very complex and dynamic, so they are relevant in the samples, so we need to make further characterization of the microorganisms and analyse their technological or pathogenicity potential.

Keywords

Portuguese artisanal cheese; Protected Denomination of Origin; autochthonous microbiome; lactic acid bacteria; microbial diversity

Índice

Lista de figuras:	1
1. Introdução	3
1.1. Queijos tradicionais portugueses	3
1.1.1. Queijo de Azeitão DOP e Queijo de Nisa DOP	4
1.1.1.1. Características dos queijos	4
1.1.1.2. Condições de fabrico	4
1.2. Microbiota autóctone	5
1.3. Diversidade microbiana	7
1.3.1. Métodos de Microbiologia convencional	8
1.3.2. Métodos moleculares	8
1.4. Objetivos	9
2. Materiais e Métodos	10
2.1. Recolha das amostras	10
2.2. Análise molecular da comunidade microbiana	10
2.2.1. Extração de DNA com <i>kit</i> comercial	10
2.2.2. Análise da diversidade	11
2.2.3. Análise metagenómica	12
2.3. Isolamento e caracterização de microrganismos autóctones	12
2.3.1. Microbiologia convencional	12
2.3.2. Microbiologia molecular	13
2.3.2.1. Análise da diversidade microbiana: amplificação por PCR	13
2.3.2.2. Análise da diversidade microbiana: eletroforese em campo pulsado	14
3. Resultados e Discussão	15
3.1. Análise da diversidade da comunidade microbiana: RAPD-PCR	15
3.2. Análise metagenómica	17
3.3. Isolamento e caracterização de microrganismos autóctones	20
3.3.1. Análise das contagens de bactérias ácido lácticas	20
3.3.2. Análise da diversidade microbiana: RAPD-PCR	23
3.3.2.1. Bactérias ácido lácticas	23
3.3.2.2. <i>Lactococcus</i>	28
3.3.2.3. <i>Enterococcus</i>	33
3.3.3. Análise da diversidade microbiana: PFGE	36
4. Conclusões	38
5. Referências Bibliográficas	39
6. Anexos	43

Lista de figuras:

Figura 1.1. Localização das regiões de Azeitão e de Nisa

Figura 3.1. Dendrograma obtido com base nos perfis de RAPD-PCR de todas as amostras

Figura 3.2. Abundâncias relativas dos géneros encontrados por análise metagenómica

Figura 3.3. Contagens de unidades formadoras de colónia no meio MRS

Figura 3.4. Contagens de unidades formadoras de colónia no meio M17

Figura 3.5. Contagens de unidades formadoras de colónia no meio SBA

Figura 3.6. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria N9 do ano de 2016

Figura 3.7. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria A2 do ano de 2016

Figura 3.8. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria N10 do ano de 2017

Figura 3.9. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria A1 do ano de 2017.

Figura 3.10. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR com o *primer* Cocon da amostra da queijaria A2 do ano de 2016

Figura 3.11. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR com o *primer* Cocon da amostra da queijaria A1 do ano de 2017

Figura 3.12. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria A3 do ano de 2016

Figura 3.13. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria A4 do ano de 2016

Figura 3.14. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria A1 do ano de 2017

Figura 3.15. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria N10 do ano de 2017

Figura 3.16. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria A2 do ano de 2016

Figura 3.17. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria N9 do ano de 2016

Figura 3.18. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria A4 do ano de 2017

Figura 3.19. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria N10 do ano de 2017

Figura 3.20. Resultados de PFGE com a enzima de restrição SmaI.

Figura suplementar 1. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria N9 do ano de 2016 e de 2017

Figura suplementar 2. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria A2 do ano de 2016 e de 2017

Figura suplementar 3. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria N10 do ano de 2017 e de 2016

Figura suplementar 4. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria A1 do ano de 2017 e de 2016

Figura suplementar 5: Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria A3 do ano de 2016 e de 2017

Figura complementar 6: Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria A4 do ano de 2016 e de 2017

Figura complementar 7: Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria A1 do ano de 2016 e de 2017

Figura complementar 8: Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria N10 do ano de 2016 e de 2017

Figura complementar 9: Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria A2 do ano de 2016 e de 2017.

Figura complementar 10: Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria N9 do ano de 2016 e de 2017

Figura complementar 11: Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria A4 do ano de 2016 e de 2017

Figura complementar 12: Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria N10 do ano de 2016 e de 2017

Tabela complementar 1: Índices de diversidade de Simpson e de Shannon-Weaver de BAL para as amostras das queijarias A1, A2, N9 e N10.

Tabela complementar 2: Índices de diversidade de Simpson e de Shannon-Weaver de *Lactococcus* para as amostras das queijarias A1, A3, A4 e N10.

Tabela complementar 3: Índices de diversidade de Simpson e de Shannon-Weaver de *Enterococcus* para as amostras das queijarias A2, A4, N9 e N10.

1. Introdução

1.1. Queijos tradicionais portugueses

Segundo o *Codex Alimentarius* (Codex standard 283, 1978), entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que apresenta pasta mole, semi-mole, semidura, dura ou extra-dura, que pode ser revestido e no qual a relação proteína/caseína do soro não excede a do leite. A obtenção deste produto resulta da coagulação parcial ou total da proteína do leite (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, nata, leitelho ou de qualquer combinação destes, coagulados pela ação do coalho ou agentes coagulantes. Após coagulação o soro resultante é drenado parcialmente, respeitando o princípio de que a elaboração do queijo resulta de uma concentração de proteína láctea e que por consequência, o conteúdo em proteína do queijo é maior do que o nível proteico dos materiais lácteos acima mencionados.

As características do queijo são resultado de ações físicas, químicas e bioquímicas que o leite e seus componentes sofrem por via de diversos fatores de transformação e agentes químicos e biológicos, nativos do leite, introduzidos ao longo do fabrico ou adicionados pelo fabricante (Guterres, 2013).

Em Portugal são comercializados e fabricados diversos queijos de elevada riqueza e especificidade, muitos dos quais com Denominação de Origem Protegida (DOP). Este conceito consiste no nome geográfico ou equiparado que designa e identifica um produto originário desse local ou região, cuja qualidade ou características se devem essencialmente ou exclusivamente ao meio geográfico específico, incluindo fatores naturais e humanos e cujas fases de produção têm lugar na área geográfica delimitada (<http://tradicional.dgadr.pt/pt/>. Consultado: 15 de março de 2018).

Além do conceito de DOP, existem ainda Indicação Geográfica Protegida (IGP) e Especialidade Tradicional Garantida (ETG). IGP refere-se ao nome geográfico ou equiparado que designa e identifica um produto originário desse local ou região que possui uma determinada qualidade, reputação ou outras características que podem ser essencialmente atribuídas à sua origem geográfica e que, em relação ao qual pelo menos uma das fases de produção, tem lugar na área geográfica delimitada. Um exemplo de um alimento com esta denominação é o queijo Mestiço de Tolosa (<http://tradicional.dgadr.pt/pt/>. Consultado: 15 de março de 2018). O conceito de ETG refere-se ao nome que designa e identifica um produto ou género alimentício produzido a partir de matérias primas ou ingredientes utilizados tradicionalmente ou resultado de um modo de produção, transformação ou composição que corresponde a uma prática tradicional. O único alimento com esta denominação em Portugal é o bacalhau de cura tradicional portuguesa ETG (<http://tradicional.dgadr.pt/pt/>. Consultado: 15 de março de 2018).

Todos os queijos possuem características únicas associadas ao fabrico contudo, apesar de muito diferentes, estes queijos possuem um conjunto de passos durante o fabrico que são comuns, tais como a coagulação, dessoramento, moldagem, prensagem e maturação.

O processo de coagulação consiste na formação de uma malha proteica que resulta da destabilização da caseína do leite por proteases resultando numa massa designada de coalhada. Este processo divide-se em duas fases, a fase enzimática, onde o coagulante destabiliza a estrutura da caseína, e a fase da agregação micelar, onde as micelas da caseína destabilizadas se agregam através do cálcio existente no meio, havendo formação de uma estrutura resistente às ações mecânicas, à medida que se vai expulsando o soro (Martins, 2009). Os agentes coagulantes mais usados em queijos tradicionais portugueses são o coalho vegetal (*Cynara cardunculus*) e o coalho animal (Freitas e Malcata, 2000). Entre os queijos que utilizam o coalho vegetal podemos encontrar os queijos de Azeitão, Évora, Nisa, Serpa e Serra da Estrela. Por outro lado, os queijos portugueses que utilizam o coalho animal são o queijo de Cabra Transmontano, Pico, Rabaçal, São Jorge e Terrincho (<http://tradicional.dgadr.pt/pt/>. Consultado: 15 de março de 2018).

Por sua vez, o processo de dessoramento consiste na expulsão da água e soro de forma a obter um produto moldável que mantenha a forma que se pretende e que apresente condições mínimas de conservação. De seguida, ocorre o processo de moldagem, onde a massa é colocada em moldes para a obter a forma e o tamanho final desejado (Guterres, 2013).

O passo durante o fabrico que mais contribui para a sua variabilidade é, na maioria dos queijos, o de maturação, pois é durante este passo que se desenvolvem as características de textura e sabor (Reis e Malcata, 2011). O período de maturação varia entre os diversos queijos, sendo que o queijo do Pico é o que apresenta menor tempo de maturação (17 dias) e os queijos de Cabra Transmontano e de São Jorge maturam durante 60 dias (<http://tradicional.dgadr.pt/pt/>. Consultado: 15 de março de 2018).

1.1.1. Queijo de Azeitão DOP e Queijo de Nisa DOP

O presente estudo analisou queijos tradicionais portugueses com DOP: queijo de Azeitão e queijo de Nisa, produzidos em áreas geográficas distintas (Figura 1.1) mas com semelhanças no fabrico como veremos a seguir.

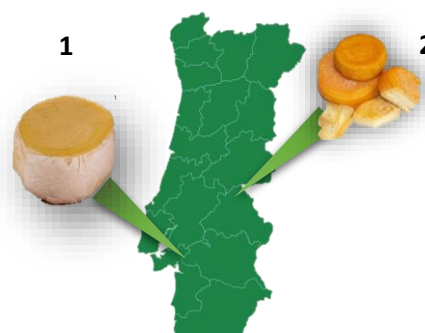


Figura 1.1. Localização das regiões de Azeitão (1) e de Nisa (2).

1.1.1.1. Características dos queijos

O queijo de Azeitão DOP é obtido a partir de leite de ovelha não pasteurizado, trata-se de um queijo curado de pasta semi-mole e amanteigado de cor branca ou ligeiramente amarelada (<http://tradicional.dgadr.pt/pt/>. Consultado: 15 de março de 2018). Possui forma cilíndrica achatada, diâmetro de 5 a 11 cm e altura de 3 a 5 cm, o peso pode variar entre 100 a 250 g (Freitas e Malcata, 2000). Este queijo é caracterizado pelo sabor picante, acidificado e salgado e o seu fabrico é restrito às regiões de Palmela, Sesimbra e Setúbal (<http://tradicional.dgadr.pt/pt/>. Consultado: 15 de março de 2018).

Por sua vez, o queijo de Nisa DOP é obtido a partir de leite de ovelha não pasteurizado, da raça regional Merina Branca e trata-se de um queijo curado, de pasta semi-dura e cor branca amarelada, com sabor ligeiramente ácido e aroma intenso (<http://tradicional.dgadr.pt/pt/>. Consultado: 15 de março de 2018). Possui uma forma de cilindro achatado, um diâmetro de 10 a 16 cm e altura de 3 a 8 cm, relativamente ao peso varia entre 200 a 1300 g (Freitas e Malcata, 2000).

1.1.1.2. Condições de fabrico

O fabrico do queijo de Azeitão começa pela filtração do leite, adição de coalho vegetal (*Cynara cardunculus*) e sal, de seguida o leite é armazenado à temperatura de 30°C durante 45 min. Após coagulação, o excesso de soro é retirado manualmente, resultando numa massa comprimida que é mantida durante 20 dias à temperatura de 10 a 12°C e humidade de 85 a 90%; durante este período os queijos são invertidos e lavados diariamente.

Tal como o anterior, o fabrico do queijo de Nisa DOP inicia-se pela adição de coalho vegetal ao leite à temperatura de 25 a 28°C durante 45 a 60 min. De seguida, remove-se parte do soro ao fazer o primeiro corte da coalhada, que é por sua vez transferida para os cinchos, onde se mexe manualmente e se salga. Por fim, procede-se à maturação em duas fases, a primeira dura 15 a 18 dias e ocorre à temperatura de 8 a 10°C com humidade relativa de 80 a 90%, a segunda fase demora 30 a 40 dias a uma temperatura de

10 a 14°C e humidade relativa de 85 a 90% (<http://tradicional.dgadr.pt/pt/>. Consultado: 15 de março de 2018).

Em ambos os queijos, a fermentação depende maioritariamente da microbiota naturalmente presente na matéria prima ou introduzida ao longo do processo de fabrico. Este consórcio de microrganismos está pouco caracterizado, não só nestes dois tipos de queijos como em todos os outros queijos tradicionais portugueses, comparativamente com outros países como veremos em seguida.

1.2. Microbiota autóctone

Durante o fabrico do queijo, o ambiente é hostil devido à presença de sal, reduzida humidade, valores de pH baixos, reduzidas temperaturas e deficiências em nutrientes, desta forma, apenas microrganismos com capacidade para tolerar estas condições ambientais sobrevivem (Settanni e Moschetti, 2010).

Como mencionado anteriormente, existem muitos estudos em que estes microrganismos foram caracterizados em queijos, principalmente em queijos de países como Itália (Coppola *et al.* 2000; Dolci *et al.* 2008; Dolci *et al.* 2010; Gobbetti *et al.* 1997; Gobbetti *et al.* 1999; Randazzo *et al.* 2002), Turquia (Aygun *et al.* 2005; Durlu-Ozkaya *et al.* 2001; Hayaloglu and Kirbag, 2007; Sengül, 2006), Grécia (Prodomov *et al.* 2001; Rantsiou *et al.* 2008), Espanha (Flórez and Mayo, 2006; López-Díaz *et al.* 2000), Irlanda (Brennan *et al.* 2002; Fitzsimmons *et al.* 1999) e Sérvia (Tenzic-Vidojevic *et al.* 2007). Um destes estudos foi o realizado no queijo Raschera DOP de Itália, um queijo semi-duro, produzido com leite de vaca e coalho animal. Neste estudo, foram utilizadas técnicas de microbiologia convencional como o isolamento em meios específicos, e de microbiologia molecular como sequenciação, *polimerase chain reaction* (PCR) com *primers* específicos para espécies e *random amplification of polymorphic DNA* (RAPD-PCR). Assim, concluíram que neste queijo o género predominante é *Lactococcus*, mais especificamente a espécie *Lactococcus lactis* (Dolci *et al.* 2008).

Noutro estudo realizado com Castelmagno DOP, queijo italiano com características semelhantes ao anterior, foi utilizada outra técnica de microbiologia molecular, *temperature gradient gel electrophoresis* (TGGE) e obtiveram que os géneros mais frequentes foram *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* (Dolci *et al.* 2010).

Relativamente a estudos realizados em Portugal, destacamos o realizado no queijo do Pico DOP, um queijo semi-mole, curado, produzido com leite de vaca não pasteurizado. Neste estudo foram identificados 114 isolados de bactérias ácido lácticas (BAL) e com auxílio das técnicas de sequenciação do gene 16S rRNA e *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE), os autores observaram que os géneros predominantes foram *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc* (Domingos-Lopes *et al.* 2017). Foi realizado outro estudo com um queijo português, queijo de São Jorge DOP, um queijo semiduro e de leite de vaca não pasteurizado, com o objetivo de identificar as bactérias ácido lácticas dominantes usando métodos fenotípicos e genotípicos. Neste estudo foram identificados 225 isolados, com os principais géneros representados da seguinte forma: 41% *Lactobacillus*, 40% *Enterococcus*, 7% *Leuconostoc*, 5% *Pediococcus* e 4% *Lactococcus* (Kongo *et al.* 2006).

Assim, independentemente dos métodos de caracterização usados e das propriedades dos queijos, na maioria dos casos os géneros mais predominantes foram *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc*, variando apenas a frequência com que cada um aparece nos diferentes queijos (Flórez and Mayo, 2006; Durlu-Ozkaya *et al.* 2001; López-Díaz *et al.* 2000; Rantsiou *et al.* 2008). Todos estes géneros bacterianos pertencem ao grupo de BAL.

As bactérias ácido lácticas são um grupo de bactérias Gram positivas, catalase-negativas, não formadoras de esporos, com baixo conteúdo de G+C e anaeróbias facultativas que têm a capacidade de

fermentar açúcares primários como a lactose para produzir ácido láctico. Esta capacidade de produzir ácido contribui para a acidificação inicial do leite e de uma forma indireta para a sinerese da coalhada, expulsão do soro, solubilização do cálcio micelar e textura do queijo; por possuírem a capacidade de degradar produtos da ação do coalho em caseína também contribuem para a proteólise do leite (Herreros *et al.* 2003).

Os principais géneros neste grupo são *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Weissella* (Makarova *et al.* 2006). Esta classificação de BAL nos diferentes géneros é baseado na morfologia, modo de fermentação da glucose, crescimento em diferentes temperaturas, configuração do ácido láctico produzido e capacidade de crescer em altas concentrações de sal (Rattanachaiakunsopon e Phumkhachorn, 2010). Sendo que estes parâmetros são muitas vezes utilizados em estudos para caracterizar o microbioma autóctone de determinados queijos quando não se utilizam técnicas de biologia molecular. Foi o caso do estudo realizado com o queijo Våldeon de Espanha, um queijo semi-mole de leite de cabra não pasteurizado e que utiliza coalho animal, onde apenas foram utilizados métodos fenotípicos de identificação como: coloração de Gram, teste da catalase, análise da morfologia e pigmentação da colónia, produção de dióxido de carbono a partir da glucose, crescimento a 10, 40 e 45°C, tolerância ao sal, hidrólise da L-arginina e hidrólise da esculina. Neste estudo, os principais géneros identificados foram *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc* (López-Díaz *et al.* 2000).

As BAL podem ser divididas em dois grupos baseados nos produtos finais formados durante a fermentação da glucose: homofermentativas e heterofermentativas. Muitas das homofermentativas pertencem aos géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* e *Streptococcus* que produzem ácido láctico como principal e único produto final da fermentação da glucose. Por outro lado, as heterofermentativas pertencem aos géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* e *Weissella* e têm como produtos finais da fermentação da glucose ácido láctico, dióxido de carbono e etanol. Para distinguir entre estes dois grupos, podem realizar-se análises à produção de etanol, de dióxido de carbono ou dos isómeros de lactato como foi efetuado num estudo de queijo Cheddar produzido na Irlanda (Fitzsimmons *et al.* 1999).

As BAL encontram-se presentes no leite por contaminação através das superfícies de produção, equipamento, ambiente da queijaria, transporte, superfícies de armazenamento, entre outros, ou por adição do fabricante na fase inicial de produção do queijo (Settanni e Moschetti, 2010).

Este grupo de bactérias possui diferentes papéis durante o fabrico do queijo. Algumas espécies participam no processo inicial de fermentação do queijo (bactérias ácido lácticas *starters* – BALS), enquanto que outras influenciam o processo de maturação do queijo (bactérias ácido lácticas não *starters* – BALNS). As primeiras são, como já vimos anteriormente, responsáveis pela acidificação do leite por produzirem rapidamente altas concentrações de ácido láctico, estas incluem espécies de *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*. As responsáveis pela maturação são na sua maioria espécies pertencentes aos géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc* (Settanni and Moschetti, 2010).

Quando analisada a evolução destes dois grupos de BAL ao longo do fabrico do queijo, observou-se que as BALS se encontram em maior número no início da maturação e decrescem significativamente ao longo desse processo (Franciosi *et al.* 2008). Por outro lado, as BALNS encontram-se em concentrações reduzidas na fase inicial de produção e aumentam em cerca de quatro ordens de magnitude em pouco tempo de maturação (Fox *et al.* 2004).

Como visto anteriormente, o processo de maturação é aquele que confere maior variabilidade às características dos diferentes queijos, não só pelo período, temperatura e humidade durante o qual ocorre, como também pela presença das BALNS. Como este grupo não é adicionado pelo fabricante, é difícil haver controlo sobre estas bactérias, sendo que cada queijo possui o seu próprio conjunto heterogéneo, conferindo características distintas até entre queijos fabricados na mesma queijaria (Franciosi *et al.* 2008).

O sabor do queijo resulta da ação de diversas enzimas que podem ser provenientes do leite, coalho ou produzidas pelo microbioma autóctone. Estas últimas possuem um conjunto de enzimas complexas com um papel na degradação de caseínas e péptidos, levando à produção de aminoácidos livres, sendo que estes contribuem indiretamente para o sabor característico do queijo, uma vez que são precursores de outras reações catabólicas originando componentes voláteis (Settanni and Moschetti. 2010).

Por outro lado, o crescimento de BAL influencia o desenvolvimento de outros microrganismos. Uma vez que bactérias deste grupo podem produzir bacteriocinas, péptidos, antimicrobianos específicos, reduzindo o risco de crescimento e sobrevivência de patógenos alimentares e organismos responsáveis pela deterioração de alimentos tais como espécies pertencentes aos géneros *Listeria*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* e *Enterococcus* conferindo maior estabilidade microbiológica aos alimentos (Settanni and Moschetti, 2010 e Soomro *et al.* 2002).

Além das bacteriocinas, estas bactérias libertam, durante a fermentação, outros metabolitos antimicrobianos como ácidos orgânicos (lático, acético e propiónico) que acidificam o meio, tornando-o não favorável para o crescimento de muitos patógenos e outros microrganismos.

Por fim, além de BAL existem outros microrganismos presentes naturalmente nos diversos queijos, tais como fungos, *Enterobacteriaceae* e coliformes. A presença destes nos queijos pode ser resultado de contaminações nas câmaras de maturação, pela água, no leite ou na salmoura, sendo que alguns podem ser indicativos das condições de higiene da própria queijaria (Guterres, 2013). Contudo a presença de alguns destes microrganismos pode ser essencial para as características organolépticas do queijo, como é o caso do queijo italiano Gorgonzola, um queijo mole produzido a partir do leite de vaca pasteurizado, caracterizado por possuir veios azuis e por isso os produtores adicionam esporos de *Penicillium roqueforti*, uma espécie de fungo que confere esta característica (Gobbetti *et al.* 1997).

1.3. Diversidade microbiana

Durante muitos anos, a deteção e identificação de microrganismos nos diferentes queijos eram baseadas em métodos bioquímicos e fenotípicos dependentes de cultura, que além de laboratorialmente intensos e consumirem muito tempo, eram pouco reprodutíveis. Desta forma, surgiu a necessidade de desenvolver métodos de biologia molecular independentes de cultura para a identificação e diferenciação de bactérias (Rosetti e Giraffa, 2005).

Os queijos tradicionais portugueses encontram-se ainda pouco caracterizados relativamente ao seu microbioma autóctone, sendo que a maioria dos estudos que existem são baseados em métodos de microbiologia convencional. É o caso do queijo de Terrincho, um queijo DOP semi-duro, produzido a partir de leite de ovelha não pasteurizado e coalho animal, em que utilizando apenas técnicas de crescimento em meios seletivos e análises fenotípicas para identificar que os principais géneros presentes neste queijo se verificou serem *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Enterococcus* (Pintado *et al.* 2007). Nos últimos anos, Portugal tem começado a seguir a tendência dos restantes países na utilização de técnicas de biologia molecular para diferenciação e identificação de microrganismos (Domingos-Lopes *et al.* 2017).

1.3.1. Métodos de Microbiologia convencional

Existe uma grande variedade de metodologias para estudar microrganismos, mais especificamente as bactérias ácido lácticas, contudo muitas destas são dependentes de cultura e por isso requerem o uso de diferentes meios.

Após isolamento dos microrganismos nos diferentes meios, existem diversos métodos pelos quais estes podem ser diferenciados e identificados baseados apenas no fenótipo apresentado. Nos estudos realizados com os queijos Lighvan do Iraque (Abdi *et al.* 2006), Valdéon de Espanha (López-Díaz *et al.* 2000), Zlatan da Sérvia (Tenzie-Vidojevic *et al.* 2007) e Parmigiano-Reggiano de Itália (Coppola *et al.* 2000) foi utilizado um conjunto diverso de análises fenotípicas que permitiram identificar as diferentes BAL presentes em cada um deles. Os primeiros testes realizados são a coloração de Gram, o teste da catalase e análise morfológica. Apenas os microrganismos Gram positivos e catalase negativos seguem para os restantes testes fenotípicos. Estes testes incluem a análise de produção de gás a partir da glucose; fermentação de diversos açúcares; incubação a diversas temperaturas (10, 30, 40 e 45°C), hidrólise da arginina e esculina, crescimento em meios com adição de NaCl (4 e 6,5%) e utilização de citrato. Apesar de serem testes de relativa facilidade, podem demorar muito tempo e são pouco reprodutíveis.

Em Portugal, os estudos de caracterização do microbioma de queijos tradicionais ainda são muitos deles baseados nestes métodos fenotípicos, como foi o caso do estudo realizado com o queijo Picante da Beira Baixa, um queijo duro produzido com uma mistura de leite de vaca e ovelha, onde foram usados os testes mencionados acima para identificar espécies de *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Lactobacillus* (Freitas *et al.* 1996).

1.3.2. Métodos moleculares

Atualmente, está à disposição dos investigadores uma grande diversidade de técnicas que permitem caracterizar de forma inequívoca o microbioma de produtos alimentares. No caso do estudo realizado no queijo Gubben da Irlanda, um queijo semi-mole de leite de vaca pasteurizado, em que o objetivo foi identificar as bactérias presentes na superfície dos queijos em quatro fases diferentes do amadurecimento, usaram uma abordagem polifásica incluindo análise fenotípica, quimiotaxonómica e genotípica, sendo que duas das técnicas usadas foram RAPD-PCR e PFGE. Neste estudo as espécies predominantes pertenciam aos géneros *Corynebacterium* e *Staphylococcus* (Brennan *et al.* 2002).

Assim, a técnica de RAPD-PCR é o método mais rápido para diferenciação da maioria das espécies bacterianas associadas a alimentos. Nesta técnica é usado um *primer* que hibrida em vários locais do genoma, ao invés do PCR convencional que exige *primers* que flanqueiam uma região específica do genoma, desta forma esta técnica permite que não seja necessário um conhecimento prévio do genoma. A temperatura de hibridação desta técnica é relativamente baixa permitindo a hibridação do *primer* com o DNA molde mesmo não havendo homologia total entre os dois. O número de cópias de cada sequência depende da eficiência da hibridação do *primer* com esta, isto porque pode haver variações no grau de homologia entre o *primer* e a sequência do DNA molde. Os perfis de RAPD-PCR gerados consistem em sequências repetidas que dependem desta homologia. Assim, o RAPD-PCR é vantajoso pois é facilmente aplicável, tem baixo custo e não requer extremo conhecimento técnico, não sendo necessário conhecer a sequência a amplificar (Kaur *et al.* 2017).

Esta técnica é uma das mais realizadas na análise microbiológica de queijos, como no caso do queijo grego Batzos, um queijo semi-duro de leite de cabra não pasteurizado, em que com o intuito de estudar a biodiversidade genotípica e fenotípica de isolados de *Lactococcus lactis* se procedeu à sua aplicação e também à da técnica de PFGE (Psoni *et al.* 2007). Esta última é um método de tipagem onde o genoma

bacteriano é digerido com enzimas de restrição, as quais reconhecem sequências específicas de DNA de cerca de seis a oito bases originando fragmentos de DNA de variados tamanhos que podem ser separados utilizando um campo elétrico que varia de direção constantemente (Foley *et al.* 2009). Por sua vez, PFGE possui um excelente poder discriminatório, elevada concordância epidemiológica e alta reprodutibilidade; contudo é um método que exige muito tempo e trabalho (Daniel, 1995).

A microbiologia alimentar tem tirado vantagem da aplicação de métodos de metagenômica para estudar a composição e evolução, assim como a distribuição espacial dos ecossistemas microbianos em processos fermentativos. Desta forma, a metagenômica tem permitido explorar a diversidade genética, as estruturas populacionais e as interações das comunidades microbianas nos seus próprios ecossistemas, permitindo caracterizar de forma detalhada e realista o microbioma presente.

Esta análise metagenômica inclui a sequenciação do gene 16S rRNA, geralmente conservado em todas as bactérias, mas que possui variabilidade suficiente para permitir o uso como ferramenta molecular para identificação bacteriana. Este gene contém nove regiões hipervariáveis (V1-V9) e a sequenciação de um conjunto destas regiões permite uma análise quantitativa e qualitativa da diversidade microbiana numa variedade de ecossistemas (Forde e O'Toole, 2013). As sequências resultantes são comparadas com a base de dados de referência de forma a identificar as unidades taxonômicas operacionais (UTO). De seguida, o número de leituras identificadas com a mesma UTO é calculado e realiza-se uma estimativa quantitativa da ocorrência de cada UTO na amostra analisada, permitindo deste modo determinar as proporções dos microrganismos presentes (Ercolini, 2013).

Esta metodologia tem sido utilizada em diversos estudos envolvendo queijos, como o estudo realizado com o queijo Provola dei Nebrodi, um queijo italiano semi-duro de leite de vaca não pasteurizado, onde esta técnica permitiu identificar diferentes espécies dos géneros *Lactobacillus* e *Pediococcus* em amostras de diferentes queijarias da região (Cronin *et al.* 2007). Esta técnica tem sido utilizada em diversos queijos italianos como Ragusano (Randazzo *et al.* 2002), Castelmagno (Dolci *et al.* 2010), Raschera (Dolci *et al.* 2008) e outros tais como o queijo Poro do México, um queijo de leite de vaca não pasteurizado com tempo de maturação reduzido, no qual procederam a um estudo com o objetivo de estudar a composição e dinâmica das comunidades bacterianas presentes durante a produção deste queijo por três queijarias. A técnica de sequenciação do gene 16S rRNA permitiu identificar que as principais espécies presentes no leite não pasteurizado pertenciam aos géneros *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Macroccoccus* e *Enhydrobacter*, no soro do leite aos géneros *Streptococcus* e *Lactobacillus* e que as espécies predominantes no produto final foram *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* (Aldrete-Tapia *et al.* 2014).

1.4. Objetivos

No competitivo mercado dos produtos tradicionais com selo de certificação (produtos de valor acrescentado), a garantia da autenticidade é fundamental para manter a confiança dos consumidores no mercado alimentar em geral e particularmente em marcas específicas de produtores. Neste contexto da segurança e qualidade alimentar, torna-se relevante a capacidade de identificar e assegurar a origem de um produto e a região onde foi produzido.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi caracterizar a comunidade microbiana autóctone presente em amostras de queijos Azeitão DOP e Nisa DOP, provenientes de diferentes queijarias de cada região usando métodos de microbiologia convencional e métodos de microbiologia molecular, incluindo uma abordagem metagenômica.

Em primeiro lugar, com o intuito de caracterizar os perfis microbiológicos das diferentes amostras, foi avaliada a diversidade da população bacteriana autóctone. Procurou verificar-se possíveis diferenças

entre amostras recolhidas em anos de produção consecutivos e entre as queijarias selecionadas procedendo-se a uma análise usando a técnica de RAPD-PCR em DNA extraído diretamente das amostras de queijo.

De seguida, a abordagem metagenómica, a sequenciação do gene 16S rRNA, foi realizada com o objetivo de obter uma fotografia completa da diversidade microbiana presente nas amostras em estudo e detetar até as comunidades menos representadas.

Por último, para uma caracterização mais detalhada dos microrganismos autóctones, foram utilizados métodos de microbiologia convencional e métodos de microbiologia molecular de diferenciação (RAPD-PCR e PFGE) de modo a agrupar os diferentes isolados do ponto de vista genómico e avaliar a diversidade microbiana de cada amostra.

2. Materiais e Métodos

2.1. Recolha das amostras

Amostras de queijo com Denominação de Origem Protegida (DOP) foram recolhidas em sete queijarias, cinco localizadas em Azeitão (A1, A2, A3, A4 e A5) e duas em Nisa (N9 e N10). De cada queijaria, recolheram-se amostras em três anos consecutivos 2016, 2017 e 2018.

As diferentes amostras de queijo foram recolhidas e divididas em alíquotas de 50-60 g em recipientes estéreis e conservadas a -80°C até à sua utilização.

2.2. Análise molecular da comunidade microbiana

Com o intuito de analisar a comunidade microbiana autóctone das amostras, começou-se por descongelar três amostras recolhidas de cada queijaria, cada uma referente a um ano de produção (2016, 2017 e 2018) e de seguida procedeu-se ao protocolo de extração de DNA, a seguir descrito, e subsequente análise por RAPD-PCR e metagenómica.

2.2.1. Extração de DNA com *kit* comercial

As amostras dos queijos foram sujeitas a um pré-tratamento antes da extração de DNA. Foram recolhidas 2 g de cada queijo, homogeneizou-se em 2 ml de etanol 20% (v/v) no vortex por 2 min. De seguida, centrifugaram-se as amostras a 3000xg durante 5 min (Hermle Labortechnik Z383 K), descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 18 ml de citrato de sódio (2% p/v). Após as amostras repousarem durante 10 min à temperatura ambiente, procedeu-se a nova centrifugação a 3000xg durante 15 min a 4°C (Hermle Labortechnik Z383 K). Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em TE (10 mM Tris e 1 mM EDTA) com proteinase K (1 mg/ml) (NZYTech, Portugal). Após incubação de 1 h a 55°C com agitação (Shimaden SR30 Modelo 3T-21), repetiu-se a centrifugação nas mesmas condições, descartou-se o sobrenadante e conservou-se o *pellet*.

Após o pré-tratamento, procedeu-se à extração de DNA usando o *kit* NZY Tissue gDNA Isolation (NZYTech, Portugal). Pesou-se 25 mg de cada amostra preparada anteriormente e colocou-se num tubo de microcentrifuga. De seguida, adicionou-se 180 µl de tampão NT1 (NZYTech, Portugal) e 25 µl da solução de proteinase K (NZYTech, Portugal). Misturou-se no vortex e os tubos foram incubados a 56°C *overnight* (Shimaden SR30 Modelo 3T-21). Após incubação, as amostras foram agitadas no vortex e adicionou-se 200 µl de tampão NL (NZYTech, Portugal) com nova agitação no vortex durante 10 s. Adicionou-se 210 µl de etanol 100% (v/v) e agitou-se no vortex. Posteriormente a mistura foi transferida para uma NZY Spin Tissue Collumn (NZYTech) colocada num tubo coletor de 2 ml e centrifugou-se

durante 1 min a 12000xg (Eppendorf 5415R). Após centrifugação, descartou-se o *flow-through*, colocou-se a coluna num novo tubo coletor e adicionou-se 500 µl de tampão NW1 (NZYTech, Portugal). Procedeu-se a nova centrifugação das amostras durante 1 min a 12000xg (Eppendorf 5415R), descartou-se o *flow-through* e colocou-se a coluna de volta no tubo coletor. Adicionou-se 600 µl de tampão NW2 (NZYTech, Portugal) a cada coluna e centrifugou-se novamente durante 1 min a 12000xg (Eppendorf 5415R). Descartou-se o *flow-through* e repetiu-se a centrifugação desta vez durante 2 min, após a qual se descartou o tubo coletor e se colocou a coluna num tubo de centrifugação. A cada coluna adicionou-se 100 µl de tampão TE (NZYTech, Portugal) e incubou-se durante 1 min à temperatura ambiente. Centrifugou-se a 12000xg durante 2 min (Eppendorf 5415R), colocou-se o *flow-through* na coluna e repetiu-se a centrifugação. Por fim, descartou-se a coluna e o tubo de centrifugação com o DNA genómico foi guardado a 4°C.

Com o intuito de avaliar a qualidade do DNA genómico extraído, este foi analisado no NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) e realizaram-se eletroforeses em géis de agarose 0,8% (p/v) em tampão TBE 0,5x (Tris-borato-EDTA, 10x: 0,89 M Tris, 0,89 M ácido bórico e 0,02 M Na₂EDTA). A cada poço foram adicionados 5 µl de DNA de cada amostra, 2 µl de azul bromofenol e 2 µl GelRed 10x (Biotium, USA), com exceção do primeiro e último poço de cada gel no qual foram adicionados 5 µl de marcador de massa molecular NZYDNA Ladder I (NZYTech, Portugal) e 2 µl de GelRed. As eletroforeses foram realizadas a 110 V durante 1 h. Procedeu-se à visualização dos géis no aparelho ChemiDoc XRS+ com auxílio do programa ImageLab.

2.2.2 Análise da diversidade

De modo a analisar o DNA extraído das amostras e comparar as suas diferenças por ano, por queijaria e por região procedeu-se à técnica de RAPD-PCR com os *primers* M13 (5'GTA AAA CGA CGG CCA 3', Cocolin *et al.* 2004) e OPC15 (5'GAC GGA TCA G 3', Vieira-Pinto *et al.* 2008).

A cada mistura de reação, adicionou-se 5 µl de Supreme NZY Taq II 2x Green Mastermix (NZYTech, Portugal), 2 µl de DNA extraído, 1 µl de *primer* (OPC15 ou M13) (STABVIDA, Portugal) para um volume final de 20 µl. De seguida, os tubos foram colocados no termociclador Doppio (VWR, USA) com as seguintes condições de PCR: desnaturação inicial 94°C durante 5 min, 40 ciclos de amplificação 94°C por 1 min, 40°C por 2 min e 72°C por 2 min e por fim alongamento final a 72°C durante 10 min.

Após amplificação, procedeu-se a eletroforese dos produtos em gel de agarose 1,2% (p/v) preparado em tampão TBE 0,5x. Ao primeiro e último poço de cada gel adicionaram-se 5 µl de NZY DNA Ladder I (NZYTech, Portugal) e 2 µl de GelRed 10x (Biotium, USA). Nos restantes poços foram distribuídos os produtos, sendo que em cada poço foram adicionados 8 µl de produto e 2 µl de GelRed. A eletroforese foi realizada a 110 V durante 2 h e 30 min e, de seguida, procedeu-se à visualização dos géis no aparelho ChemiDoc XRS+ com auxílio do programa ImageLab.

Para analisar os perfis de RAPD-PCR foi utilizado o programa BioNumerics (versão 6.6.5 Applied Maths, Bélgica). Esta análise teve como objetivo avaliar a semelhança entre as amostras, comparar os perfis por região e por ano. Procedeu-se à normalização dos perfis, usou-se o coeficiente de correlação de Pearson para análise da semelhança entre os perfis das diferentes amostras e construíram-se dendrogramas tendo em conta o método de aglomeração pela média aritmética não ponderada (UPGMA).

2.2.3 Análise metagenómica

O protocolo de sequenciação foi realizado pela empresa DNASense © (<http://dnasense.com/>, Aalborg, Dinamarca). Foram enviados 25 µl de DNA extraído de cada uma das amostras e referentes aos anos de 2016, 2017 e 2018 e sequenciaram-se as regiões variáveis V1-V3 do gene 16S rRNA (Caporaso *et al.* 2012) com a plataforma MiSeq (Illumina, USA), usando os *primers* desenhados por Ward *et al.* 2012.

2.3. Isolamento e caracterização de microrganismos autóctones

Depois de realizada a análise ao microbioma total das amostras, procedeu-se à caracterização de um grupo específico de microrganismos autóctones presentes nas amostras dos anos de 2016 e 2017, tendo por base técnicas de microbiologia convencional e microbiologia molecular.

2.3.1. Microbiologia convencional

Inicialmente, procedeu-se ao isolamento dos microrganismos a partir das amostras de queijo em meios seletivos. Pesou-se 25 g de cada amostra e adicionou-se 225 ml de água peptonada tamponada (APT, Sharlau, Espanha), de seguida colocaram-se as amostras num homogeneizador peristáltico (Stomacher, Lab-Blender 400) durante 2 min (ISO 6887-5, 2010; NP 3005-1985). Após homogeneização, de cada amostra retirou-se 1 ml para um tubo de ensaio contendo 9 ml de solução de Ringer (Oxoid, Reino Unido) e procedeu-se à realização de diluições seriadas de 1:10 (ISO 6887-5, 2010; NP 3005:1985).

Posteriormente, inocularam-se 100 µl de cada uma das seguintes diluições: 10⁻²; 10⁻³; 10⁻⁴; 10⁻⁵ e 10⁻⁶ em placas de meio Man Rogosa and Sharpe agar (MRS, Sharlau, Espanha) utilizando a técnica de espalhamento com zaragatoa, com o objetivo de isolar bactérias ácido lácticas (BAL). De seguida, estas placas foram incubadas a 30°C durante 72 h em condições de anaerobiose com auxílio de um gerador de anaerobiose (Genbox anaer, bioMérieux, França).

Adicionalmente, do grupo de BAL, foram selecionados dois géneros para isolamento e caracterização mais detalhada: *Lactococcus* e *Enterococcus*. Para isolamento de elementos do género *Lactococcus* foram inoculadas as diluições anteriormente preparadas: 10⁻⁴; 10⁻⁵; 10⁻⁶; 10⁻⁷; 10⁻⁸ e 10⁻⁹ em placas de meio M17 (Frilabo, Portugal) utilizando a mesma técnica de espalhamento com zaragatoa de 100 µl de cada diluição. Estas placas incubaram-se a 30°C durante 72 h em condições de microaerofilia (Genbox, bioMérieux, França).

Procedeu-se ao isolamento de membros do género *Enterococcus* ao inocular as diluições 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³; 10⁻⁴ e 10⁻⁵ em placas de meio Slanetz Bartley Agar (SBA, Sharlau, Espanha). Estas placas foram incubadas a 37°C durante 48 h em condições de aerobiose.

De seguida, realizaram-se as contagens das células viáveis nas placas contendo entre 30 a 300 colónias. Com os dados recolhidos, calculou-se o número de unidades formadoras de colónias por massa (UFC/g) tendo em conta a seguinte fórmula:

$$UFC/g = n^{\circ} \text{ de colónias} \times \frac{1}{\text{diluição}} \times \frac{1}{\text{volume de inóculo}}$$

2.3.2. Microbiologia molecular

Após a contagem das colónias, selecionaram-se isolados da placa referente à primeira diluição com número de colónias contáveis de cada uma das amostras e de cada ano. Colocaram-se estes isolados numa placa dividida em quadriculas com meio MRS no caso das BAL, meio M17 no caso de *Lactococcus* e meio SBA no caso de *Enterococcus* em condições de incubação idênticas às do processo de isolamento. Esses microrganismos foram de seguida caracterizados por RAPD-PCR e PFGE.

2.3.2.1. Análise da diversidade microbiana: amplificação por PCR

Extraíu-se o DNA de cada isolado com o método de choque térmico, que consiste em retirar com um palito parte de cada colónia para um tubo contendo tampão TE (10 mM Tris e 1 mM EDTA) e 0,1 % (v/v) Tween 20, colocar à temperatura de 100°C durante 10 min e de seguida colocar rapidamente em gelo. Por fim, procedeu-se a centrifugação durante 2 min a 15000xg (Eppendorf 5415R) e as amostras foram guardadas a -20°C até utilização.

De modo a diferenciar os isolados de cada amostra de queijo e a correlacioná-los com os isolados presentes noutras amostras procedeu-se à sua análise com a técnica de RAPD-PCR.

Começou-se por selecionar 20% do total das colónias de BAL do meio MRS de cada amostra de 2016 e de 2017, 20% do total das colónias do género *Lactococcus* do meio M17 e 20% do género *Enterococcus* do meio SBA e centrifugou-se o DNA de cada isolado durante 2 min a 15000xg (Eppendorf 5415R) com o objetivo de depositar quaisquer restos celulares presentes na mistura e removeu-se 2 µl de sobrenadante para a reação de amplificação. De seguida, preparou-se a mistura de reação: 5 µl de Supreme NZY Taq II 2x Green Mastermix (NZYTech, Portugal), 2 µl de produto de extração, 1 µl de *primer* OPC15 (5' GAC GGA TCA G 3', STABVIDA, Portugal) para um volume final de 20 µl.

As condições da amplificação selecionadas no termociclador Doppio (VWR, USA) foram: desnaturação a 94°C durante 5 min, 40 ciclos de amplificação com desnaturação a 94°C por 1 min, *annealing* a 40°C por 2 min e extensão a 72°C por 2 min e o passo de extensão final a 72°C durante 10 min.

Após amplificação, procedeu-se à eletroforese dos produtos da amplificação em gel de agarose 1,2% (p/v) preparados em tampão TBE 0,5x (NZYTech, Portugal). Nos géis, no primeiro e último poço de cada pente adicionaram-se 5 µl de marcador NZY DNA Ladder I (NZYTech, Portugal) e 2 µl de GelRed. Nos restantes poços, foram distribuídos os produtos da amplificação sendo que em cada poço adicionaram-se 8 µl de produto e 2 µl de GelRed. A eletroforese foi realizada a 110 V durante 3 h. Procedeu-se à visualização dos géis no aparelho de ChemiDoc XRS+ com auxílio do programa ImageLab.

Para analisar os perfis de RAPD-PCR foi utilizado o programa BioNumerics (versão 6.6.5 Applied Maths, Bélgica). Deste modo procedeu-se à normalização dos perfis usando o coeficiente de correlação de Pearson para análise da semelhança entre os perfis das diferentes amostras e desta forma construir dendrogramas tendo em consideração o método de aglomeração pela média aritmética não ponderada (UPGMA).

Após análise dos perfis de RAPD-PCR obtidos com OPC15, selecionou-se um conjunto de isolados de BAL e procedeu-se a uma análise com a técnica de RAPD-PCR utilizando o *primer* Cocon (5' AGC AGC GTG G 3', STABVIDA, Portugal) (Conconcelli *et al.* 1995 and Conconcelli *et al.* 1997). Assim, começou-se por centrifugar os isolados selecionados durante 2 min a 15000xg (Eppendorf 5415 R) e retirou-se 2 µl do sobrenadante para a amplificação. Preparou-se a reação de amplificação: 2 µl de tampão NZY Reaction 10x (NZYTech, Portugal), 2 µl do DNA do isolado, 1 µl de *primer* Cocon, 1,75µl

de NZY MgCl₂ (50 mM) (NZYTech, Portugal), 0,5 µl de NZY dNTP (10 mM) (NZYTech, Portugal) e 0,4 µl de NZY Taq DNA polimerase 5 U/µl (NZYTech, Portugal) num volume final de 25 µl. As condições de amplificação e da eletroforese foram as mesmas que utilizadas anteriormente.

Calculou-se o nível de reprodutibilidade da técnica de RAPD-PCR ao realizar-se 10% de réplicas. Com o objetivo de analisar o poder discriminante e a diversidade presente em cada conjunto de microrganismos analisados, BAL, *Enterococcus* e *Lactococcus*, calcularam-se os índices de diversidade de Simpson (D) (Hunter e Gaston, 1988) e de Shannon-Weaver (J') (Tramer, 1969). O índice de Simpson (D) mede a probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso pertencerem ao mesmo grupo genómico, contudo como o índice é inversamente proporcional à diversidade, aplicou-se o complementar (D'=1-D), que se refere à probabilidade de selecionar aleatoriamente dois indivíduos e estes pertencerem a grupos diferentes, sendo que p varia de 0 a 1.

$$D' = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s nj(nj-1)$$

Na fórmula, *N* representa o número total de isolados analisados, o *s* representa o número total de grupos formados e o *nj* o número total de isolados de cada grupo formado.

O índice de Shannon-Weaver (J') permitiu medir dois componentes distintos, a riqueza de grupo genómico e a uniformidade das abundâncias dos grupos. Este índice representa a proporção entre a diversidade observada e o máximo de diversidade possível.

$$H' = \frac{N \log_2 N - \sum_{j=1}^s nj \log_2 nj}{N} \quad H'_{\text{máx}} = \log_2 s \quad J' = \frac{H'}{H'_{\text{máx}}}$$

Na fórmula, *N* representa o número total de isolados analisados, o *s* o número total de grupos formados, o *nj* o número total de isolados de cada grupo formado e *J'* o rácio de diversidade observada sobre a diversidade máxima possível.

2.3.2.2 Análise da diversidade microbiana: eletroforese em campo pulsado

A eletroforese em campo pulsado (PFGE) foi utilizada para diferenciar os isolados de cada grupo de bactérias, os quais tinham sido analisados pela técnica de RAPD-PCR. O protocolo utilizado foi uma adaptação de Smith *et al.* 1988 e de Gosiewski *et al.* 2015.

Desta forma, começou-se por recolher, com uma ansa, parte da colónia em estudo e colocou-se num tubo com 1,5 ml de Ringer (Oxoid, Reino Unido). Dilui-se a suspensão (1:10) numa cuvette com 1,5 ml de Ringer e mediu-se a absorvância a 600 nm (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Inglaterra). Com base nos valores de absorvância calculou-se o número de células/ml da suspensão bacteriana e o volume necessário para obter 5x10⁹ células/ml utilizando as seguintes fórmulas:

$$n^{\circ} \text{ de células/ml} = (Abs_{600nm} * 5 \times 10^8) * 10$$

$$Volume \text{ necessário} = \frac{5 \times 10^9}{n^{\circ} \text{ de células/ml}}$$

Colocou-se o volume calculado num tubo e recolheram-se as células por centrifugação a 15000xg a 4°C durante 5 min (Eppendorf 5415R). Após centrifugação, descartou-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* celular com 1 ml de solução PIV (0,01M Tris, pH 8; 1 M NaCl) e repetiu-se a centrifugação nas mesmas condições. Após descartar o sobrenadante, ressuspendeu-se o *pellet* em 500 µl de solução de PIV e adicionou-se igual volume (500 µl) de 1,5% de agarose *low melting* (SeaPlaque, FMC) em PIV a 42°C. Colocou-se a mistura numa seringa de 1 ml (Omnifix, Braun) e deixou-se solidificar a 4°C.

Posteriormente, prepararam-se os discos de agarose. Cortou-se a extremidade da seringa de forma a obter uma saída larga e bem aparada e depois com auxílio de uma lamela de microscopia cortou-se cerca de 8 discos com espessura de 1 mm para um tubo contendo 1 ml de solução de lise (6 mM Tris, pH 8; 1 M NaCl; 0,1M EDTA; 0,2% desoxicolato de sódio; 0,5% lauril sarcosinato de sódio; 50 µg/ml RNase A; 2 mg/ml lisozima) e incubaram-se os tubos durante 14 h a 37°C com agitação suave. Após a incubação, removeu-se a solução de lise e adicionou-se 10 ml de solução ES (0,5 M EDTA, pH 9; 1% lauril sarcosinato de sódio) agitando suavemente. Esta solução foi removida e adicionou-se 5 ml de solução ESP (0,5M EDTA, pH 9; 1% lauril sarcosinato de sódio, 1mg/ml de proteinase K) e incubou-se a 50°C durante 3 dias com agitação suave.

Após incubação com proteinase K, procedeu-se a uma série de lavagens com 1 ml de TE, em que se iniciou por remover a totalidade da solução ESP, adicionou-se o TE agitando ligeiramente e deixou-se por 1 h. Após esse período, o tampão TE foi removido e substituído por 1 ml de tampão TE novo. Este processo foi repetido de hora a hora, oito vezes. De seguida, removeram-se dois discos de agarose e incubaram-se na solução de restrição com 1 µl de enzima *SmaI* (NZYTech, Portugal), 7,5 µl de tampão de restrição NZY 10x (NZYTech, Portugal), 66,5 µl de água miliQ para um volume final de 75 µl a 25°C durante 16 h. Após incubação, adicionou-se 5 µl de azul bromofenol com intenção de interromper a digestão.

Os discos digeridos foram colocados num gel de agarose PFGE 1,2% (p/v) (NZYTech, Portugal) preparado em TBE 0,5x. Os fragmentos de restrição foram separados com base no seu tamanho por ação de um campo elétrico pulsátil no aparelho de eletroforese em campo pulsado (CHEF-DR® III variable angle system, Bio-Rad, USA), desta forma as condições de corrida foram: temperatura a 14°C, ângulo de 120°, circulação a 70%, voltagem de 6 V/cm, tempo inicial de pulso 5 s e tempo final de 35 s, enquanto que o tempo total de corrida foram 22 h. O marcador molecular utilizado foi Lambda PFG Ladder, New England Biolabs, Inc (NEB).

Corou-se o gel com brometo de etídeo (10 mg/l) durante 15 min e descorou-se durante 30 min em água destilada. Por fim, fotografou-se o gel no aparelho ChemiDoc XRS+ com auxílio do programa ImageLab. As imagens dos diferentes géis foram analisadas visualmente.

3. Resultados e Discussão

3.1. Análise da diversidade da comunidade microbiana: RAPD-PCR

Na Figura 3.1 apresenta-se o dendrograma obtido para todas as amostras recolhidas ao longo de três anos. Tendo em consideração as amostras da queijaria N9 de Nisa foi possível observar que as amostras dos diferentes anos apresentaram níveis de semelhança muito baixos entre si, sendo que nunca se encontram agrupadas num único *cluster*, mostrando que existem grandes variações de ano para ano na comunidade microbiana das amostras desta queijaria.

Relativamente às amostras da queijaria N10 de Nisa, observou-se que a amostra do ano de 2016 se encontra separada das restantes, enquanto que as amostras de 2017 e 2018 encontram-se agrupadas num *cluster* com nível de semelhança de 58,7% entre si. Assim, tendo em consideração todas as amostras da região de Nisa, estas apresentam sempre níveis de semelhança baixos entre si, mostrando que a comunidade microbiana entre as duas queijarias é distinta e varia ao longo do tempo.

Por outro lado, após análise das amostras da queijaria A1 de Azeitão observou-se que apresentam um nível de semelhança de 45% e que entre a amostra de 2016 e 2018 o nível é de 69,5%. Assim, apesar de haver diferenças na comunidade microbiana nos diferentes anos não é tão significativa como a observada nas amostras das queijarias de Nisa.

Quando analisadas as amostras da queijaria A2 observa-se que existe uma grande diversidade na comunidade microbiana pois todas as amostras apresentam perfis muito distintos entre si com níveis de semelhança muito reduzidos. O mesmo se observou para as amostras da queijaria A3, A4 e A5. Assim, as amostras de Azeitão apresentaram grande variedade dentro da região, pois não se formou um *cluster* único com apenas amostras das queijarias de Azeitão; o mesmo se observou com as amostras da região de Nisa.

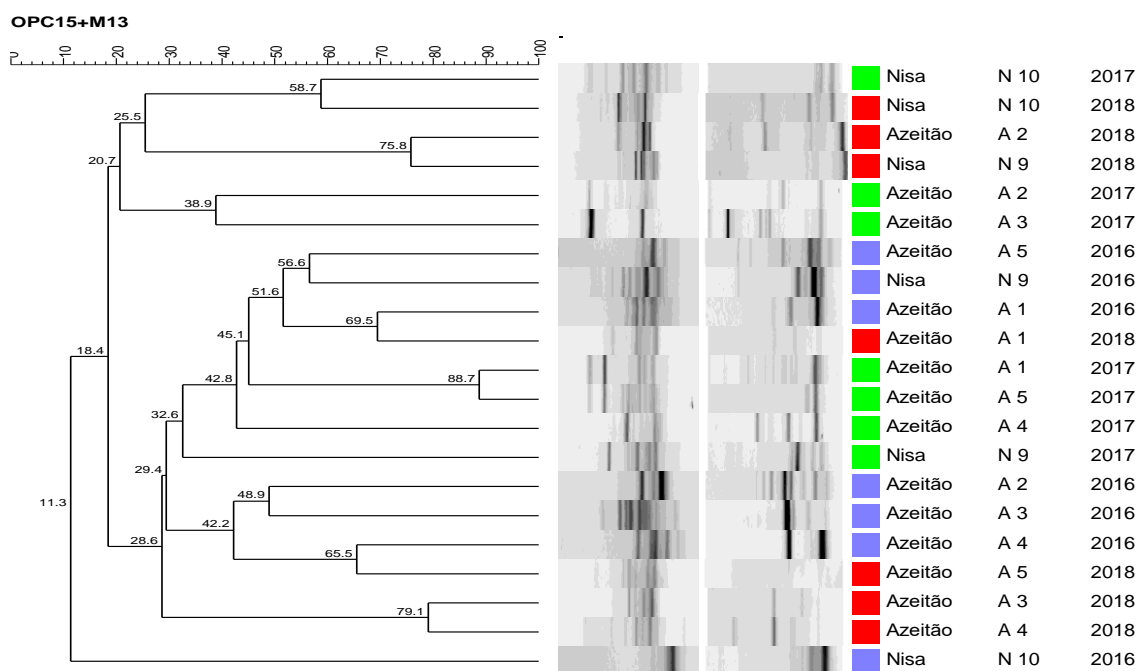


Figura 3.1. Dendrograma obtido com base nos perfis de RAPD-PCR das amostras em estudo. Os quadrados a azul representam as amostras de 2016, a verde as amostras de 2017 e a vermelho de 2018.

Observou-se que algumas amostras de Nisa apresentam níveis de semelhança elevado com amostras de Azeitão, como é o caso da amostra da queijaria A2 de 2018 e a amostra da queijaria N9 de 2018 que apresentaram um nível de semelhança de 75,8%, demonstrando que estas duas amostras apresentam uma comunidade microbiana muito semelhante entre si. Outro conjunto que apresentou elevado nível de semelhança entre si foram as amostras da queijaria de A1 de 2017 e da queijaria A5 de 2017 com um nível de 88,7%, mostrando que no ano de 2017 as amostras destas duas queijarias apresentavam uma comunidade microbiana muito semelhante entre si.

Assim, a comunidade microbiana não é característica da região de produção do queijo pois as amostras em estudo não se dividem em *clusters* consoante a região onde foram produzidas. Isto deve-se também ao facto de que em ambos os tipos de queijos são utilizadas matérias primas semelhantes tais como leite de ovelha e o coalho vegetal. Apesar de haver algumas semelhanças entre os perfis, cada amostra possui um perfil característico único. O facto de se utilizar leite não pasteurizado e não se adicionar microrganismos pelo fabricante, permite que haja menor controlo sobre os microrganismos presentes nas amostras e por sua vez justificar a diferença nas comunidades microbianas de cada amostra, mesmo em amostras da mesma queijaria mas produzidas em anos distintos.

Foi realizado um estudo semelhante com o queijo Herrgård da Suécia, um queijo semi-duro produzido com leite de vaca pasteurizado e coalho animal. O objetivo deste estudo foi comparar o microbioma de amostras deste queijo produzidas em queijarias situadas em regiões distintas utilizando a técnica de RAPD-PCR. Tal como no nosso estudo, os autores observaram que cada amostra possuía um perfil de

RAPD-PCR característico e único, contudo os níveis de semelhança entre as diferentes amostras foram superiores ao que nós observámos. Estes níveis de semelhança mais elevados são justificados pelo facto de que no fabrico do queijo Herrgård é utilizado leite pasteurizado e são adicionados pelo fabricante na fase inicial de produção um conjunto de microrganismos, o que origina maior homogenia da comunidade microbiana mesmo em amostras produzidas em áreas geográficas distintas (Antonsson *et al.* 2001).

3.2. Análise metagenómica

As amostras foram enviadas para sequenciação na empresa DNASense© (<http://dnasense.com/>, Aalborg, Dinamarca) com o objetivo de obter um conhecimento mais aprofundado da comunidade microbiana de cada uma das amostras relativamente aos principais géneros presentes.

No total da análise foram encontrados quatro filos em todas as amostras dos diferentes queijos, Firmicutes (72,7%), Actinobacteria (13,6%), Proteobacteria (9,1%) e Fusobacteria (4,5%), o que é concordante com o estudo realizado no queijo do Pico dos Açores onde os quatro filos mais predominantes foram também Firmicutes (86,7%), Actinobacteria (0,3%), Proteobacteria (12,9%), e Bacteroidetes (0,1%) (Riquelme *et al.* 2015) e no queijo Poro do México onde os mesmos quatro filos (Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria e Bacteroidetes) foram encontrados em percentagens semelhantes (Aldrete-Tapia *et al.* 2014). As diferenças entre os três queijos em termos de percentagem dos diferentes filos podem ser devidas à diferente origem do leite entre os três, sendo que as amostras deste estudo são produzidas com leite de ovelha não pasteurizado e o queijo do Pico e o queijo Poro do México com leite de vaca não pasteurizado (Riquelme *et al.* 2015; Aldrete-Tapia *et al.* 2014).

Nas amostras em estudo foram identificados 22 géneros: *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Brochothrix*, *Carnobacterium*, *Glutamicibacter*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Vagococcus*, *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Kurthia*, *Marinilactibacillus*, *Macroccoccus*, *Bavariicoccus*, *Propionibacterium*, *Hafnia-obesumbacterium*, *Lactobacillaceae* *Pseudomonas*, *Weissella* e *Aerococcus*.

O género *Lactococcus* está presente em todas as amostras e na maioria é o mais predominante (Figura 3.2), sendo que as bactérias deste género pertencem ao grupo das bactérias ácido lácticas e contribuem para a acidificação da coalhada e para a proteólise da caseína, possuindo um papel essencial no fabrico do queijo (Plaza *et al.* 2006). A predominância deste género foi também visível nos estudos realizados no queijo Raschera de Itália (Dolci *et al.* 2008) e no queijo Castelmagno de Itália (Dolci *et al.* 2010), apesar de ambos serem queijos produzidos com leite de vaca não pasteurizado e com coalho animal.

Outros membros de BAL detetados são as bactérias do género *Enterococcus*. A presença destas é comum em queijos fabricados a partir de leite não pasteurizado, como foi comprovado nos estudos realizados com o queijo do Pico (Riquelme *et al.* 2015), Terrincho (Pintado *et al.* 2007) e Orinotyri da Grécia (Prodromov *et al.* 2001). Em algumas situações, a sua presença pode ser indicativa de problemas de higiene durante o processo de fabrico, contudo também possuem influência no sabor do queijo. Os níveis destas bactérias nas amostras de Azeitão e de Nisa são relativamente baixos, sendo que a abundância relativa mais elevada foi de 7,5% na amostra da queijaria A5 do ano de 2018.

Lactobacillus e *Leuconostoc* são os géneros também pertencentes ao grupo de BAL que apresentam valores mais elevados de abundância relativa e estes possivelmente contribuem de forma positiva para o sabor e texturas características de queijos como comprovado com os estudos no queijo Ragusano (Randazzo *et al.* 2002), no queijo Feta da Grécia (Kumar *et al.* 2014) e nos queijos Cabrales, Casin, Genestoso, Peñamellera e Porrúa de Espanha (Alegría *et al.* 2013).

Em todas as amostras o género *Staphylococcus* estava presente em níveis reduzidos de abundância relativa, sendo que as amostras são provenientes de leite de ovelha não pasteurizado, este é uma possível fonte de contaminação deste patógeno. Pois em estudos realizados com outros queijos também fabricados com leite não pasteurizado como o queijo do Pico (Riquelme *et al.* 2015), e os queijos Carra (Aygün *et al.* 2005) e Kuflu da Turquia (Hayaloglu *et al.* 2007), observou-se a presença de microrganismos deste género ainda que em pequenas quantidades.

Quando se analisa a mesma queijaria e se compara os três diferentes anos de produção (Figura 3.2) é possível verificar que os padrões de abundância variam por ano, principalmente os referentes aos géneros com abundâncias menores. Na maioria dos casos os géneros mais abundantes foram *Lactococcus* e *Leuconostoc*, sendo que os restantes géneros encontram-se em abundâncias muito diversas e nem todos estão presentes em todas as amostras. Existem géneros que só foram identificados em determinados anos de produção, como o género *Aerococcus*, que apenas está presente em três amostras da região de Azeitão, todas elas produzidas no ano de 2016. Este género é considerado um contaminante de leite não pasteurizado e algumas espécies são patogénicas para o Homem (Rasmussen, 2016), desta forma os microrganismos deste género encontram-se presentes nas amostras devido ao uso de leite de ovelha não pasteurizado e possivelmente a origem do leite no ano de 2016 poderá ter sido a mesma para as três queijarias justificando assim a sua presença apenas nestas três amostras de 2016.

O género *Weissella*, também um género pertencente ao grupo de BAL, foi apenas identificado na amostra da queijaria A2 do ano de 2016 e o género *Marinilactibacillus* só está presente em duas amostras de 2017. Este género pertence ao grupo de BAL halofílicas e normalmente é encontrado em ambiente marinho, contudo já foi encontrado em queijos moles da Alemanha e França (Maoz *et al.* 2003 e Feurer *et al.* 2004) e em diversos queijos europeus como Blue da Itália, Blue-Brie da Alemanha, Brie da França, Camembert da França e Tilsitter da Suíça (Ishikawa *et al.* 2006). É conhecido que os microrganismos deste género necessitam de uma determinada concentração de NaCl, crescem a temperaturas reduzidas, fermentam lactose, têm atividade anti-listeria, produzem amónia, hidrolisam caseína do leite e crescem em condições anaeróbias e aeróbias, desta forma, pensa-se que a presença destes no queijo não é devida ao leite não pasteurizado mas sim ao sal que é adicionado durante a salga (Ishikawa *et al.* 2006).

As diferenças entre queijarias foram observadas a nível dos filos, sendo que as amostras da queijaria A1 apresentaram maior proporção de Firmicutes (75%) e as amostras da queijaria N9 apresentaram menor proporção (66,7%). Foi, também, observado que o filo Fusobacteria foi identificado apenas em amostras das queijarias da região de Azeitão, devido a estas apresentarem maior humidade o que é favorável ao desenvolvimento de microrganismos deste filo (Deltenserie *et al.* 2014).

Os restantes filos estavam presentes em todas as amostras, no caso do filo Proteobacteria estava presente em maior proporção nas amostras da queijaria N9 (13,3%) e em menor proporção nas amostras da queijaria A5 (6,2%). Por fim, o filo Actinobacteria também se encontrava em maiores proporções nas amostras da queijaria N9 (20%) e em menor nas amostras da queijaria A1 (10%).

Esta diversidade de filos da comunidade microbiana é concordante com o observado no estudo realizado com o queijo do Pico no qual a comunidade microbiana apresenta variações entre queijarias apesar de serem da mesma região, pois os autores observaram que quando comparando o microbioma de três queijarias distintas da região, as amostras apresentam diferenças no microbioma ao nível dos vários filos apresentados (Riquelme *et al.* 2015).

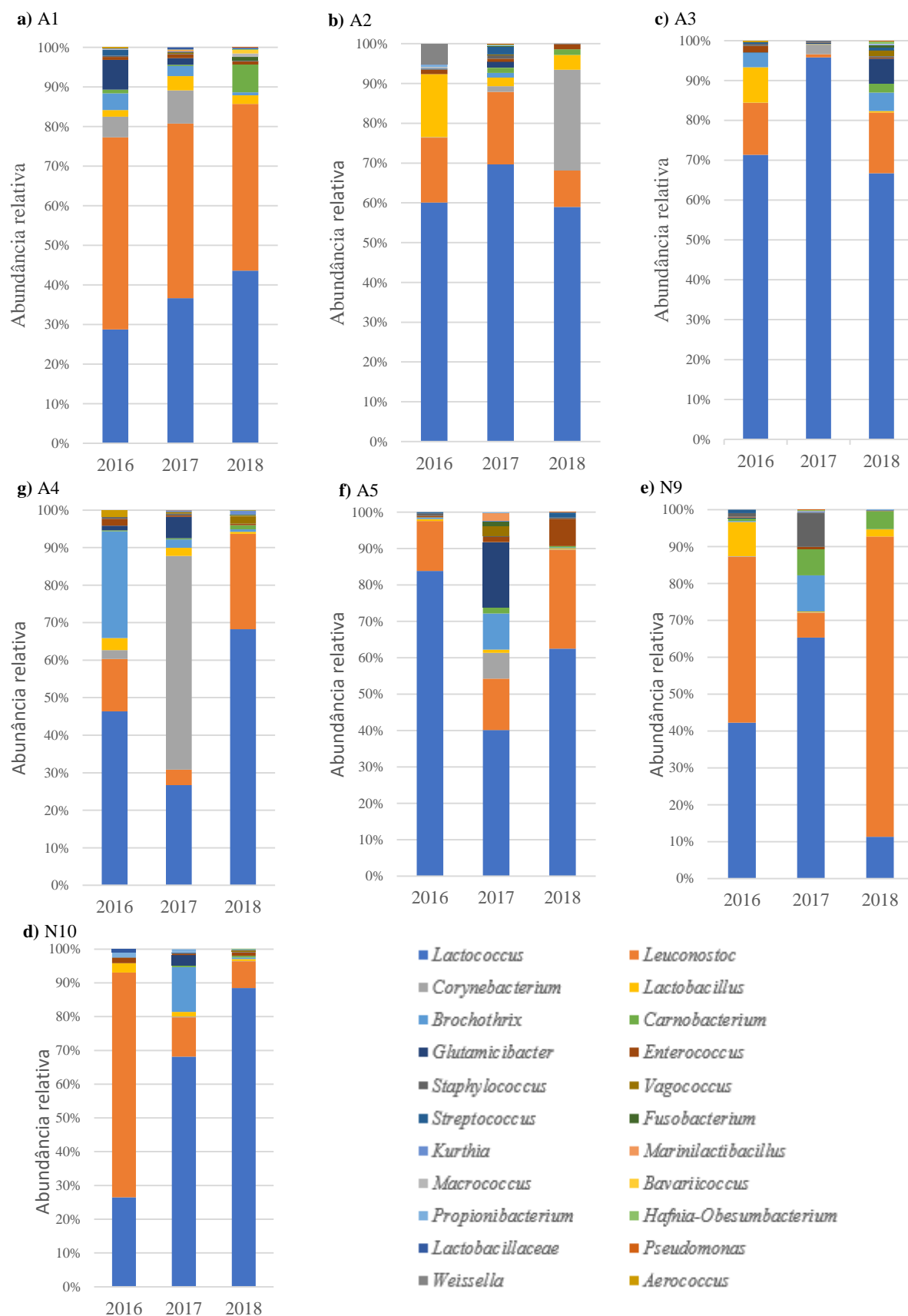


Figura 3.2. Abundâncias relativas dos gêneros bacterianos detetados por análise metagenômica.

Tendo em consideração as BAL, o grupo de bactérias em maior dominância em todas as amostras das diferentes queijarias e dos diferentes anos de fabrico, o género mais dominante deste grupo foi *Lactococcus*, com exceção das amostras da queijaria A1 dos anos de 2016 e 2017, as da queijaria N9 dos anos de 2016 e 2018 e da queijaria N10 do ano de 2016 onde o género mais abundante foi o *Leuconostoc* e na amostra da queijaria A4 do ano de 2017 onde o género mais comum foi *Corynebacterium*. Estudos anteriores demonstraram que os microrganismos do género *Corynebacterium* colonizam a pele de animais e o trato gastrointestinal do Homem (Martins *et al.* 2018), desta forma a presença destes em queijos tradicionais pode ocorrer por contaminação durante a recolha do leite do animal e durante a produção do próprio queijo. Outros estudos comprovaram que os microrganismos deste género encontram-se em grande número à superfície dos queijos (Chombo-Morales *et al.* 2016), podendo justificar a elevada abundância relativa deste género na amostra produzida na queijaria A4 do ano de 2017, com a possibilidade de que no passo de recolha da amostra se retirou mais crosta do queijo.

3.3. Isolamento e caracterização de microrganismos autóctones

3.3.1. Análise das contagens de bactérias ácido lácticas

A análise da diversidade de microrganismos autóctones não foi realizada em amostras do ano de 2018 por terem sido recolhidas nos meses de abril e maio de 2018 e não ter sido possível proceder à sua análise a tempo dos resultados serem inseridos no presente estudo.

Primeiramente, procedeu-se ao isolamento de microrganismos do grupo de bactérias ácido lácticas por estarem presentes em grande abundância em todas as amostras como verificado após análise metagenómica.

Por contagem observou-se elevado número de unidades formadoras de colónias, em alguns casos superior a 10^{10} UFC/g (Figura 3.3). As amostras das queijarias de Azeitão apresentaram diferenças significativas entre os dois anos de fabrico (2016 e 2017), sendo que as amostras de 2016 exibiram valores superiores aos visíveis nas amostras de 2017. As amostras da região de Nisa, apresentaram diferenças, sendo que a amostra da queijaria N9 apresenta contagens semelhantes entre os dois anos, enquanto que a amostra da queijaria N10 apresenta o mesmo perfil que as amostras de Azeitão, ao ser visível maior número de UFC no ano de 2016 do que no de 2017.

Os valores observados são concordantes com estudos realizados em outros queijos de características semelhantes às amostras analisadas neste estudo. O queijo Manchego é um queijo semi-mole de leite de ovelha que apresentou valores de BAL semelhantes (10^7 UFC/g) aos observados nas amostras recolhidas nas queijarias de Azeitão no ano de 2017 (Cabezas *et al.* 2007). Por outro lado, quando analisado o queijo Terrincho DOP, um queijo semi-duro de leite de ovelha, observaram valores (10^9 UFC/g) superiores aos verificados nas amostras das queijarias de Nisa. Esta diferença pode ser justificada pela origem do leite de ovelha, sendo que no queijo de Nisa o leite provém de ovelhas da raça Merina e no queijo Terrincho o leite provém de ovelhas da raça Churra. Além disso também existe diferença nos tempos de maturação que pode influenciar as contagens observadas (Pintado *et al.* 2007).

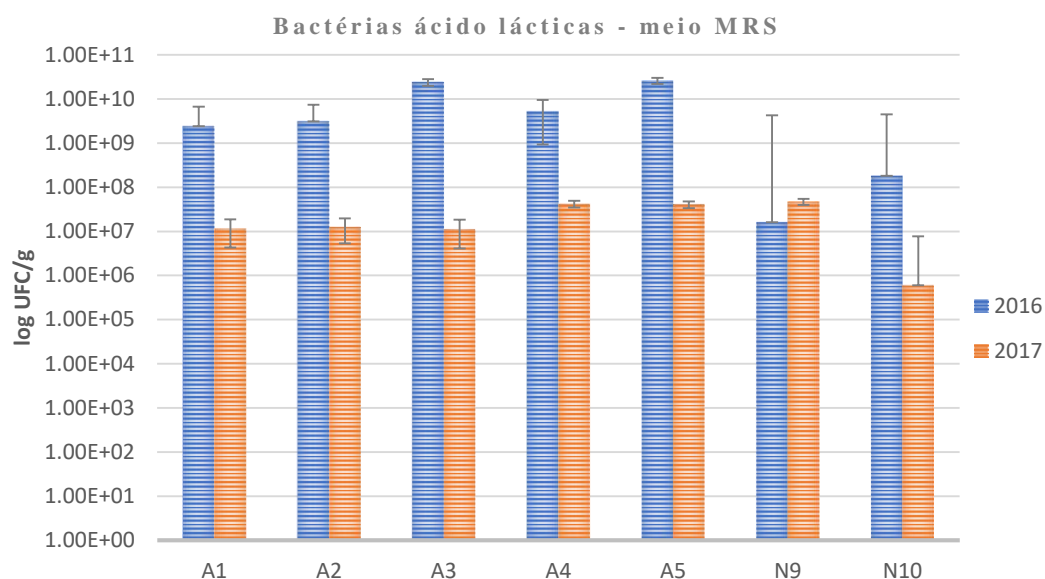


Figura 3.3. Contagens de unidades formadoras de colónias no meio MRS.

Posteriormente, selecionaram-se dois géneros pertencentes ao grupo de BAL para isolamento e caracterização: *Lactococcus* e *Enterococcus*. Considerando o género *Lactococcus* (Figura 3.4.), escolhido por ser o género mais abundantes na maioria das amostras, como se verificou na análise metagenómica do gene 16S rRNA, foi possível observar que as amostras de todas as queijarias de Azeitão apresentaram contagens semelhantes em ambos os anos de produção (2016 e 2017) e essas contagens são relativamente elevadas encontrando-se em média na ordem de 10^9 UFC/g. Quando comparado com o valor apresentado no estudo com o queijo Manchego (10^7 UFC/g), é possível observar que há maior número nas amostras de Azeitão do que no Manchego, contudo essa diferença pode ser resultado das metodologias ou materiais de isolamento usados e/ou também devido aos tempos de maturação, sendo que o de Azeitão tem um tempo de maturação de 20 dias e o de Manchego de 60 dias (Cabezas *et al.* 2007).

Nas amostras de Nisa verificou-se uma diferença nas contagens entre os dois anos, as amostras de 2016 de ambas as queijarias apresentaram valores inferiores de UFC do que as amostras de 2017. Uma das causas desta diferença pode ser que, quando se realizou a recolha de parte da amostra no ano de 2017, se tenha recolhido mais da parte interna do queijo do que da crosta, pois é conhecido através de outros estudos que o interior é mais rico em microrganismos deste género do que a crosta (Flórez *et al.* 2006). Os valores das amostras do ano de 2016 são concordantes com o observado no estudo realizado com o queijo Terrincho, onde o valor foi de 10^8 UFC/g (Pintado *et al.* 2007).

Tendo em conta as amostras em estudo e excluindo as amostras de Nisa de 2017, foi possível observar que houve diferenças entre as contagens observadas nas amostras das queijarias de Azeitão e as amostras das queijarias de Nisa. Esta diferença é justificada pelas características dos próprios queijos, sendo o queijo de Nisa, um queijo semi-duro, menos húmido (valor de atividade de água inferior) e possuindo mais sal que o queijo de Azeitão, condições não favoráveis para o crescimento de microrganismos do género *Lactococcus* (Freitas e Malcata. 2000 e Pintado *et al.* 2008).

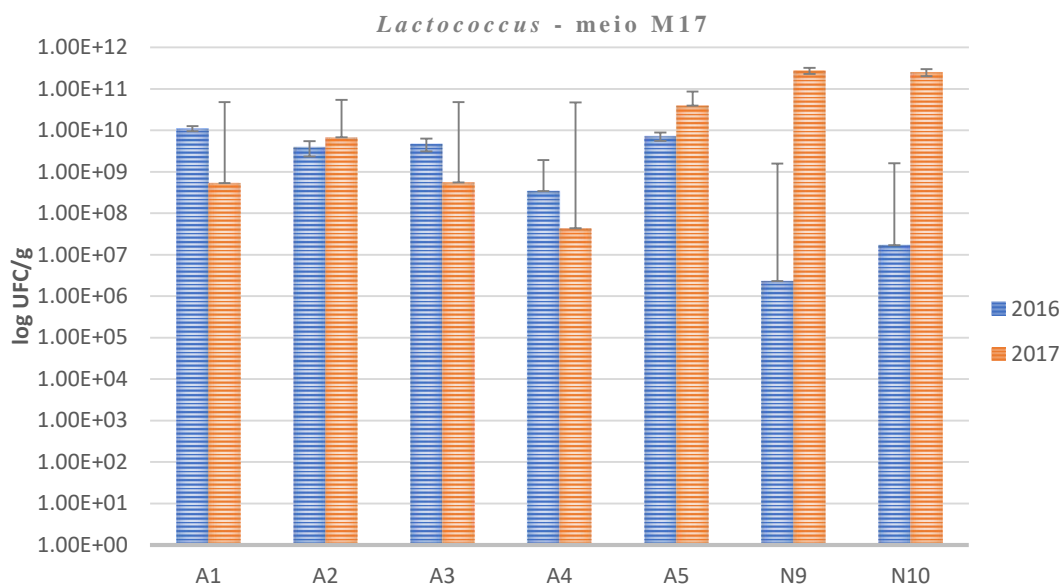


Figura 3.4. Contagens de unidades formadoras de colónias no meio M17.

O isolamento de microrganismos do género *Enterococcus* permitiu observar que as contagens de UFC (Figura 3.5) são menores do que as observadas para o género *Lactococcus*. Tendo em conta as amostras das queijarias da região de Azeitão, conclui-se que as de 2016 apresentaram maiores contagens relativamente às de 2017. Quando comparamos as amostras analisadas com o queijo de Manchego, onde o valor das contagens foi de 10^5 UFC/g, é possível verificar que este valor é concordante com os observados nas amostras do ano de 2017, apesar desta comparação não pode ser feita de forma direta uma vez que os meios utilizados para o isolamento foram diferentes entre os dois queijos (Cabezas *et al.* 2007). Quando se consideram as amostras das queijarias de Nisa as contagens são semelhantes entre os dois anos e são inferiores aos valores descritos para o queijo Terrincho (10^7 UFC/g), esta discrepância pode estar associada às próprias características dos queijos ou relacionada com as condições de higiene das diversas queijarias (Pintado *et al.* 2007).

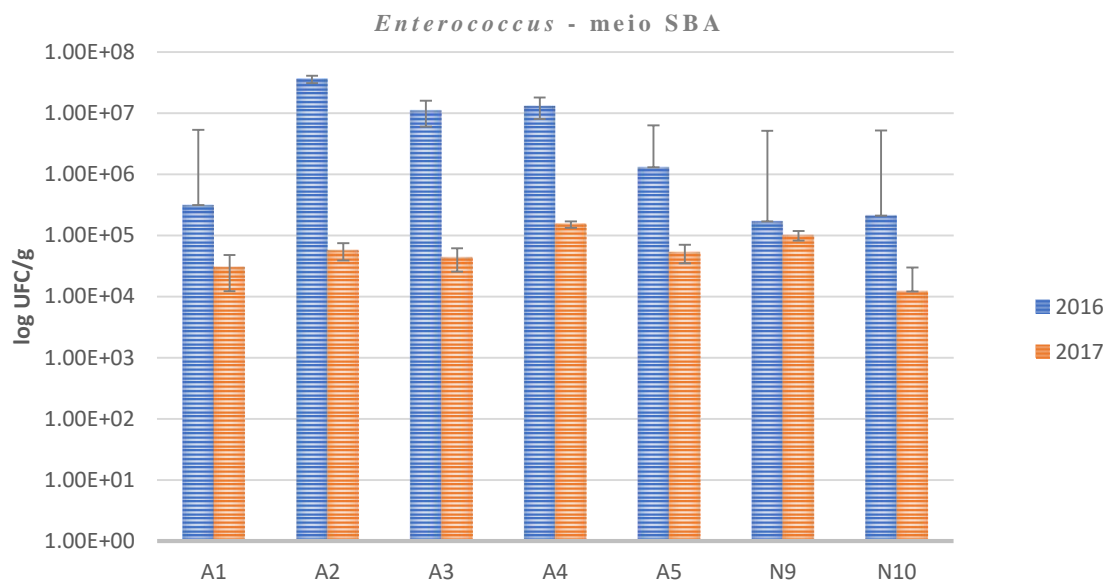


Figura 3.5. Contagens de unidades formadoras de colónias no meio SBA.

3.3.2. Análise da diversidade microbiana: RAPD-PCR

Para avaliação da reprodutibilidade da técnica, repetiu-se a técnica de RAPD-PCR com o correspondente a 10% dos isolados analisados e com auxílio do programa BioNumerics calculou-se o nível de semelhança entre o isolado e a respetiva réplica. De seguida calculou-se a média de todos os níveis de semelhança e determinou-se o nível de reprodutibilidade de 80%, representando um nível elevado de reprodutibilidade para esta técnica e coerente com outros estudos realizados em queijos, como no estudo com o queijo Parmigiano Reggiano onde o nível de reprodutibilidade também foi de 80% (Bove *et al.* 2011).

Para análise dos dendrogramas foi necessário estabelecer uma linha de corte para definir os *clusters*. A linha de corte escolhida em alguns estudos corresponde ao nível de reprodutibilidade mas após análise dos diferentes perfis dos isolados em estudo e dos dendrogramas verificou-se que uma linha de corte de 80% não seria adequada para o presente estudo e optou-se por selecionar uma linha de corte de 60%. Por fim, depois de traçar a linha de corte e estabelecer os *clusters*, calcularam-se os índices de diversidade de Simpson (D') e de Shannon-Weaver (J').

3.3.2.1. Bactérias ácido lácticas

Para facilitar a leitura deste documento, selecionaram-se para análise detalhada apenas duas amostras de cada ano: a amostra da queijaria que apresentou maior diversidade de perfis e a amostra da queijaria que apresentou menor diversidade.

A amostra produzida no ano de 2016 que apresentou maior diversidade de perfis foi a amostra da queijaria N9 (Figura 3.6) e a que apresentou menor diversidade de perfis foi a amostra da queijaria A2.

É possível observar que os isolados da amostra da queijaria N9 de 2016 agrupam-se em três *clusters* (A, B e C), A composto por 23 isolados, o B composto por dois isolados e o C por apenas um isolado. Para esta amostra os índices de Simpson e de Shannon-Weaver foram $D'=0,218$ e $J'=0,392$, respetivamente (índices de diversidade, Tabela suplementar 1). Apesar de ser a amostra que apresenta maior número de perfis, a sua diversidade é muito reduzida sendo que a maioria dos isolados apresenta um perfil com nível de semelhança muito elevado, demonstrando a dominância de uma estirpe relativamente às restantes. Este resultado de pouca diversidade de BAL é concordante com os resultados da análise metagenómica uma vez que se observou que cerca de 95% das UTO analisadas pertenciam apenas a três géneros deste grupo: *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus* e que só o género *Leuconostoc* apresentou uma abundância relativa de 45%. Desta forma, tendo em conta que apenas se analisou cerca de 20% do total de colónias existe a possibilidade de se terem selecionado isolados na sua maioria de um dos géneros anteriormente mencionados.

A análise conjunta dos perfis obtidos das amostras dos anos de 2016 e 2017 (queijaria N9, Figura suplementar 1). Revelou que os isolados agrupam-se em oito *clusters*, o *cluster* A composto por 21 isolados do ano de 2017, o B por um isolado de 2016, o C por dois isolados de 2017, o D por 23 isolados de 2016, o E por um isolado de 2017, o F por dois isolados de 2016, o G por um isolado de 2017 e o H por um isolado de 2016. Desta forma, não foram observados perfis comuns aos diferentes anos de produção, mais uma vez demonstrando que a comunidade microbiana de cada queijo varia consoante o ano de produção, contudo teriam de ser realizadas mais análises ao longo do tempo para comprovar este facto.

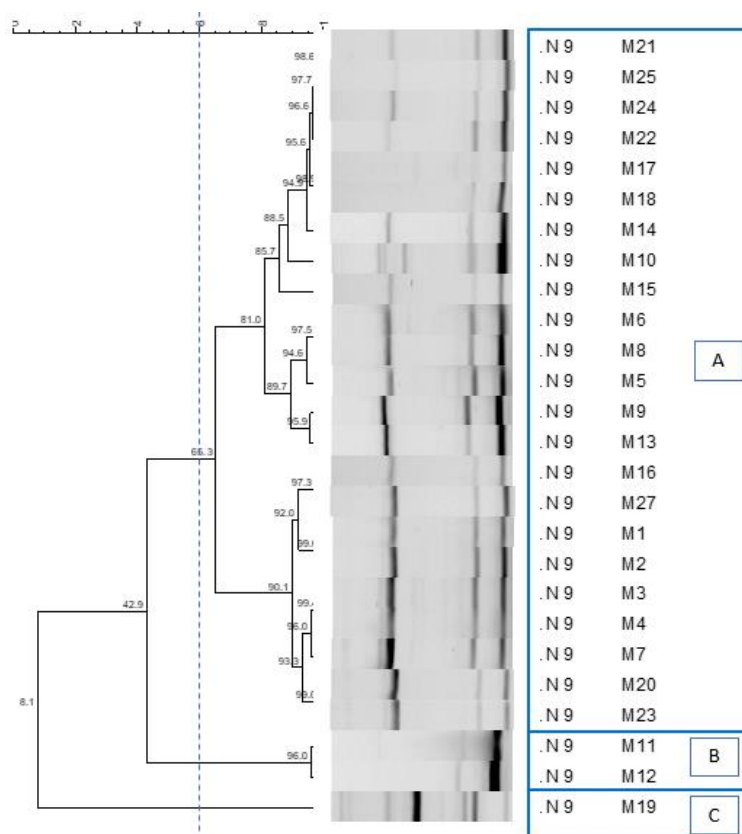


Figura 3.6. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria N9 do ano de 2016.

A linha, a azul, a tracejada, representa a linha de corte de 60% para a diferenciação de *clusters* e os retângulos indicam os diferentes *clusters* formados.

A amostra produzida no ano de 2016 com menor diversidade de perfis foi a da queijaria A2 (Figura 3.7), sendo que todos os perfis possuíam níveis de semelhança muito elevados, superiores a 88% e por isso formou-se um único *cluster*. Os índices de diversidade foram ambos de zero (índices de diversidade, Tabela suplementar 1), demonstrando que os isolados selecionados pertenciam todos à mesma estirpe. Tendo em consideração os resultados de metagenômica, a pouca diversidade de BAL também foi observada uma vez que cerca de 60% das UTO observadas pertenciam ao gênero *Lactococcus*. Analisou-se que tendo em conta ambas as amostras de 2016, apesar do grupo de BAL ser um grupo que abrange um conjunto grande de gêneros, existem gêneros dominantes relativamente aos restantes tanto em amostras da região de Azeitão como de Nisa.

Ao analisar os dois anos em conjunto (queijaria A2, Figura suplementar 2), observa-se a formação de nove *clusters*, sendo o *cluster* A composto por quatro isolados de 2017, os *clusters* B, C, D, E, H e I são formados cada um por um isolado de 2017, o F por 12 isolados de 2017, o G por 26 isolados de 2016 e três isolados de 2017. Observar que a amostra de 2017 possuía maior diversidade de perfis do que a amostra do ano anterior, igualmente os valores dos índices de diversidade que ano de 2016 foram zero e no ano de 2017 foram $D'=0,750$ e $J'=0,761$ (índices de diversidade, Tabela suplementar 1), demonstrando não só maior diversidade de perfis mas também maior divisão dos isolados pelos diferentes *clusters*. Apesar de no ano de 2016 ter sido observado maior número de UFC/g e tendo em conta que na análise metagenômica a amostra de 2017 apresentou uma dominância de UTO (70%) do gênero *Lactococcus*, os isolados de 2017 escolhidos para análise apresentaram maior diversidade; contudo é observável a maior abundância de uma estirpe relativamente às restantes (*cluster* G). Nas amostras desta queijaria, existe uma estirpe que se mantém em ambos os anos de produção, sendo que

é dominante na amostra do ano de 2016 mas no ano de 2017 está presente em menor abundância. Seria interessante em trabalhos futuros analisar esta estirpe, observar se se mantém nos anos de produção seguintes e analisar o seu potencial tecnológico nas amostras em estudo.

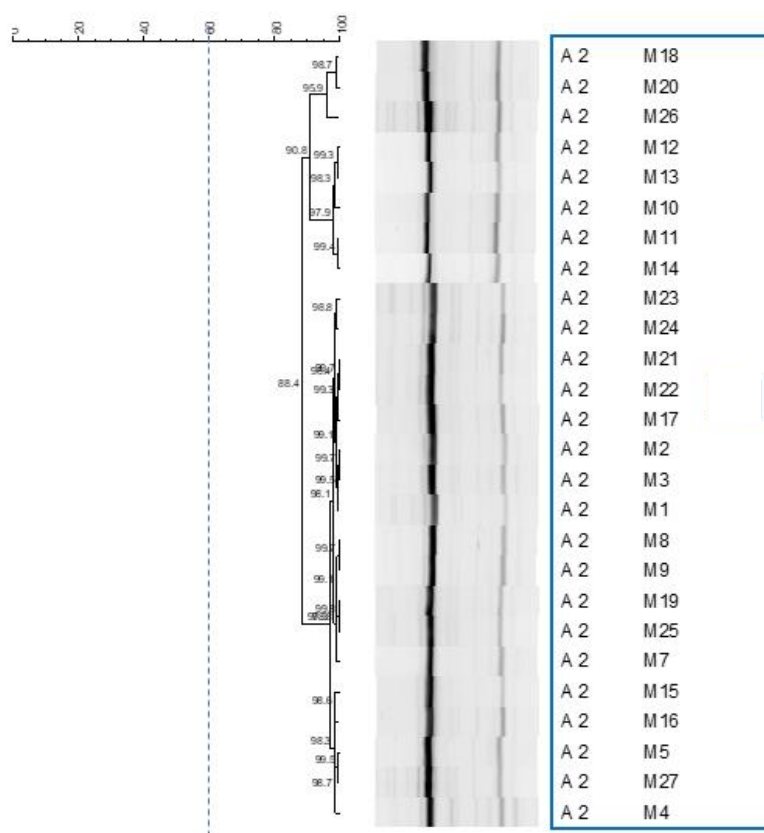


Figura 3.7. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria A2 do ano de 2016.

A linha, a azul, a tracejada, representa a linha de corte de 60% para a diferenciação de *clusters* e os retângulos indicam os diferentes *clusters* formados.

Relativamente às amostras do ano de 2017, observou-se que a que apresentou maior diversidade de perfis foi a amostra da queijaria N10 de Nisa (Figura 3.8). Escolhendo uma linha de corte de 60% foi possível observar que se formaram nove *clusters*: o A, o B, o C, o H e o I compostos cada um por um isolado, o D e o F compostos por dois isolados cada, o E por dez isolados e o G por seis isolados. Os valores dos índices de diversidade de Simpson e de Shannon-Weaver foram respetivamente $D'=0,793$ e $J'=0,800$ (índices de diversidade, Tabela suplementar 1), muito superiores aos calculados para a amostra da queijaria N9 de 2016, que era a amostra com maior diversidade de perfis de 2016, comprovando que no ano de 2017 a diversidade microbiana é superior.

Quando comparados os dois anos em simultâneo (queijaria N10, Figura suplementar 3) observaram-se nove *clusters*, o *cluster* A é composto por 23 isolados de 2016 e um isolado de 2017, o B, o D, o H e o I por um isolado de 2017, o C por dez isolados de 2017, o E e o G por dois isolados de 2017 e o F por seis isolados de 2017. É possível observar que a amostra de 2017 apresentou uma diversidade de perfis muito superior ao que tinha sido observado na amostra de 2016, onde apenas foi observado um único perfil. Este perfil visível em todos os isolados de 2016, também foi visível num único isolado de 2017 (M24), comprovando que, como já tinha sido observado nas amostras da outra queijaria de Nisa (N9), a comunidade microbiana destas amostras varia bastante de ano para ano. Esta diversidade foi também observada na análise metagenómica uma vez que na amostra do ano de 2016, 90% das UTO observadas pertenciam apenas a dois géneros *Lactococcus* (25%) e *Leuconostoc* (65%) enquanto que na amostra de

2017 90% das UTO observadas pertenciam a quatro gêneros distintos apesar de haver supremacia do gênero *Lactococcus* (67,9%) justificando a diferença entre os perfis nos diferentes anos.

Esta maior diversidade pode influenciar de forma positiva ou negativa as características organoléticas dos diferentes queijos, de forma que será interessante analisar o potencial tecnológico e até mesmo o potencial patogênico de determinados isolados de forma a entender a sua influência na maturação do queijo e perceber se todos os isolados têm essa influência ou se apenas um conjunto destes.

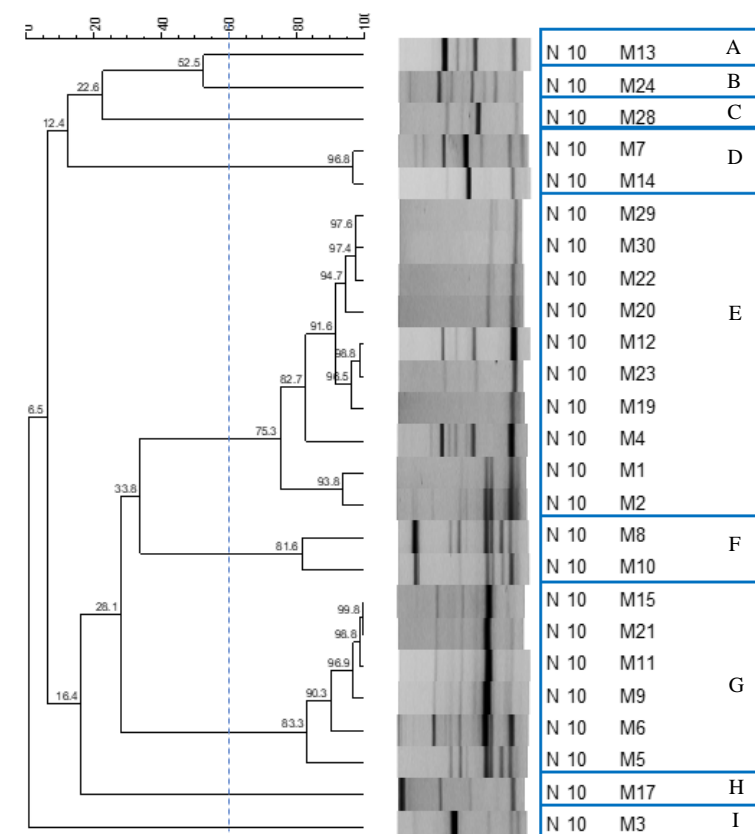


Figura 3.8. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria N10 do ano de 2017.

A linha, a azul, a tracejada, representa a linha de corte de 60% para a diferenciação de *clusters* e os retângulos indicam os diferentes *clusters* formados.

A amostra do ano de 2017 que apresentou menor diversidade de perfis foi a amostra da queijaria A1 (Figura 3.9). Formaram-se quatro *clusters*: o A composto por nove isolados, o B por um isolado, o C por quatro isolados e o D por cinco isolados. Os valores dos índices de diversidade foram $D' = 0,696$ e $J' = 0,738$ (índices de diversidade, Tabela suplementar 1), inferiores aos calculados para a amostra da queijaria N10 de 2017 e superiores aos da amostra da queijaria N9 de 2016, comprovando mais uma vez a maior diversidade de perfis presentes nas amostras de 2017.

Quando comparados os isolados dos dois anos em conjunto (queijaria A1, Figura suplementar 4) observam-se seis *clusters*, o A composto por nove isolados de 2017, o B por um isolado de 2017, o C por um isolado de 2016, o D por cinco isolados de 2017 e um isolado de 2016, o E por 22 isolados de 2016 e o F por cinco isolados de 2017. Foi visível, novamente, um maior número de perfis distintos no ano de 2017 do que no ano de 2016 e apenas existe um perfil comum em ambos os anos, comprovando que nas amostras da queijaria A1 a comunidade do grupo de BAL apresentou diferenças consoante o ano de produção. Esta diferença também visível nos índices de Simpson e de Shannon-Weaver que foram muito superiores no ano de 2017 ($D' = 0,696$ e $J' = 0,738$) relativamente com os observados no ano de 2016 ($D' = 0,163$ e $J' = 0,314$) (índices de diversidade, Tabela suplementar 1). Contudo as amostras desta queijaria são as que apresentam menores variações nos perfis de abundâncias relativas resultantes

da sequenciação observando-se a dominância de *Leuconostoc* e *Lactococcus*. As diferenças nos *clusters* formados poderão estar associadas ao facto de apenas se terem seleccionado 20% do total de colónias.

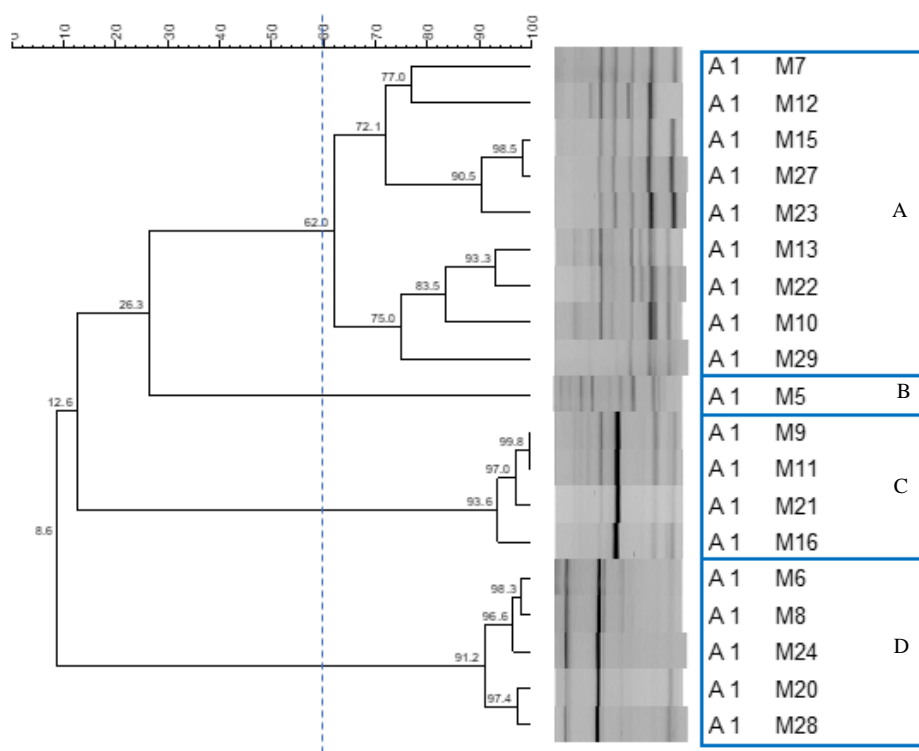


Figura 3.9. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria A1 do ano de 2017.

A linha, a azul, a tracejada, representa a linha de corte de 60% para a diferenciação de *clusters* e os retângulos indicam os diferentes *clusters* formados.

Posteriormente, seleccionaram-se isolados que representassem determinados perfis e realizou-se a técnica de RAPD-PCR usando o *primer* Cocon. Considerando a amostra da queijaria A2 do ano de 2016 (Figura 3.10), todos os isolados apresentaram todos um perfil muito semelhante, comprovando que existe pouca diversidade no grupo de BAL presente nesta amostra e que o problema não se deve ao *primer* usado na técnica de RAPD-PCR, mas sim que os isolados seleccionados pertencem todos à mesma estirpe. Em ambos os casos os índices de Simpson e de Shannon-Weaver foram zero.

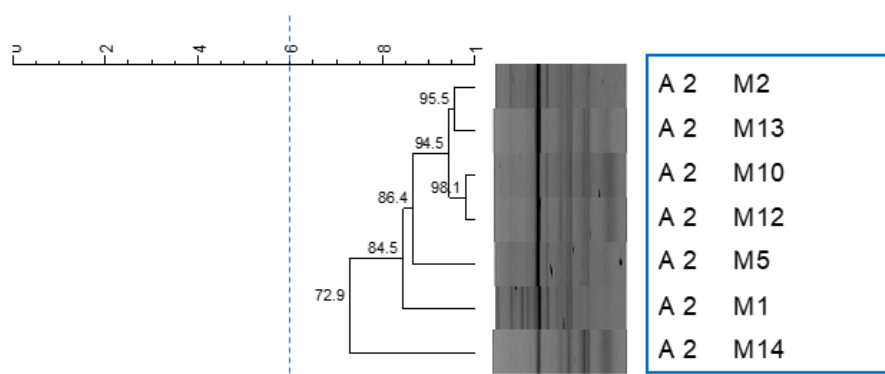


Figura 3.10. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR com o *primer* Cocon da amostra da queijaria A2 do ano de 2016.

A linha, a azul, a tracejada, representa a linha de corte de 60% para a diferenciação de *clusters* e os retângulos indicam os diferentes *clusters* formados.

Relativamente à amostra da queijaria A1 do ano de 2017 (Figura 3.11), utilizou-se uma linha de corte de 70%, porque 60% não permitia a diferenciação correta. Foi possível observar que os isolados se agruparam em dois *clusters*, o A composto por sete isolados e o B por quatro isolados. Quando se analisaram os isolados do primeiro *cluster*, com base nos perfis obtidos com o *primer* OPC15, estes não possuíam um perfil tão idêntico como com os observados com o *primer* Cocon, demonstrando que o *primer* OPC15 possui uma capacidade de diferenciação superior ao do *primer* Cocon.

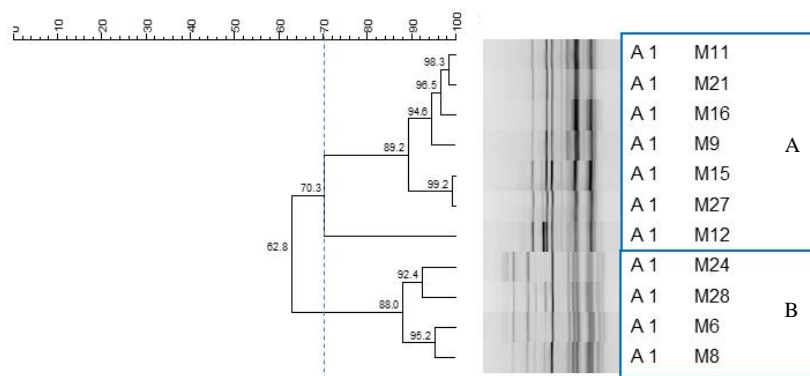


Figura 3.11. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR com o *primer* Cocon da amostra da queijaria A1 do ano de 2017. A linha, a azul, a tracejada, representa a linha de corte de 70% para a diferenciação de *clusters* e os retângulos indicam os diferentes *clusters* formados.

Esta técnica de RAPD-PCR é muito utilizada em estudos para análise da diversidade de BAL, como foi o caso do estudo realizado com o queijo Mozzarella do Brasil onde o principal objetivo foi a avaliação da diversidade de BAL autóctones viáveis isoladas a partir desse queijo. Apesar de não ter sido utilizado o mesmo *primer* que no presente estudo, os autores observaram que as 20 estirpes de BAL isoladas agruparam-se em 12 *clusters* distintos, sendo que estes representavam as seguintes espécies: *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *E. durans*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus fermentum*, *L. casei*, *L. delbrueckii* e *L. helveticus*. Com este estudo comprovaram a prevalência e a viabilidade de estirpes de BAL específicas em queijarias e demonstraram que a técnica de RAPD-PCR é adequada para a diferenciação de BAL (Silva *et al.* 2015). Comparativamente ao estudo referenciado, as amostras estudadas de queijos portugueses, na sua generalidade, apresentaram menor diversidade e considerando os resultados da metagenômica também se provou que os géneros predominantes são distintos dos observados no queijo Mozzarella, explicando desta forma as diferenças nas características entre os diferentes queijos.

3.3.2.2. *Lactococcus*

Do grupo de BAL selecionou-se o género *Lactococcus* para análise da diversidade. Da mesma forma que na análise anterior, apenas se detalha a análise das amostras com maior e com menor diversidade de perfis dos anos de produção de 2016 e 2017.

Tendo em conta as amostras do ano de 2016, a que apresentou maior diversidade foi a produzida na queijaria A3 (Figura 3.12). Quando se considerou uma linha de corte de 60%, observou-se que os isolados se dividiram em cinco *clusters*, o A composto por 11 isolados, o B por um isolado, o C por cinco isolados, o D por cinco isolados e o E por um isolado. Desta forma, os índices de Simpson e de Shannon-Weaver foram $D' = 0,704$ e $J' = 0,801$, respetivamente (índices de diversidade, Tabela suplementar 2), demonstrando a elevada diversidade. Analisando o valor do índice de Shannon-Weaver, mais especificamente, é possível analisar que o número de isolados por cada *cluster* é equivalente, demonstrando que não existe supremacia de uma estirpe relativamente às restantes.

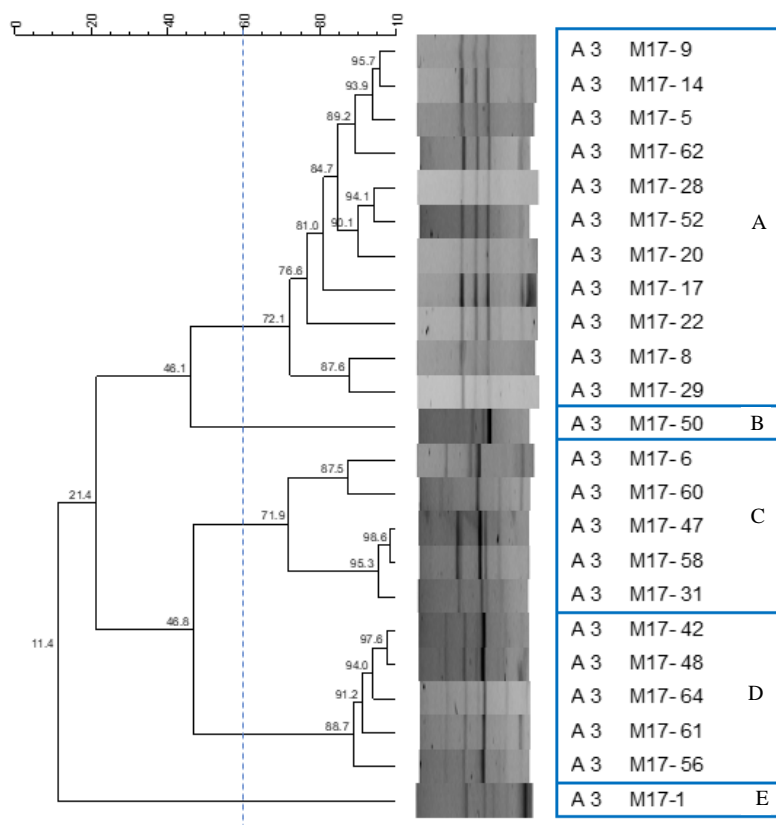


Figura 3.12. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria A3 do ano de 2016.

A linha, a azul, a tracejada, representa a linha de corte de 60% para a diferenciação de *clusters* e os retângulos indicam os diferentes *clusters* formados.

Quando se comparam os isolados dos dois anos (queijaria A3, Figura suplementar 5) observou-se que os isolados se dividiram em 15 *clusters*: o A, o F e o J compostos por dois isolados de 2017 cada, o B, E e N por um isolado de 2016 cada, o I, L, M, O e P por um isolado de 2017 cada, o C por 11 isolados de 2016, o D por seis isolados de 2016 e três isolados de 2017, o G por cinco isolados de 2016 e oito isolados de 2017 e o H por três isolados de 2017. Em primeiro lugar observou-se que, tal como aconteceu com BAL, a amostra de 2017 apresenta diversidade de perfis superior à amostra de 2016 como se pode observar pelos índices de diversidade que no ano de 2016 foram $D'=0,704$ e $J'=0,801$ e no ano de 2017 foram $D'=0,877$ e $J'=0,886$ (índices de diversidade, Tabela suplementar 2).

Existem dois perfis em comum entre as duas amostras, comprovando que apesar da comunidade de *Lactococcus* variar consoante o ano de produção, deverá haver duas estirpes que estão sempre presentes. Para confirmar esta conclusão deveriam ser realizadas análises a amostras da mesma queijaria de anos de produção posteriores de forma confirmar a manutenção destes perfis, de seguida também poderiam ser realizadas análises para saber o potencial tecnológico destas estirpes uma vez que se sabe que existem estirpes de *Lactococcus* com influência na maturação de queijos. Com base na análise metagenómica, foi possível observar que este género é dominante em ambos os anos de produção. As abundâncias relativas são muito distintas entre os dois anos, no ano de 2016 foi 70% enquanto que no ano de 2017, 95%. Sendo um género dominante na amostra de 2017 é de esperar que exista uma maior diversidade de estirpes deste género.

A amostra do ano de 2016 que apresentou menor diversidade de perfis foi a da queijaria A4 (Figura 3.13), tendo-se observado a formação de dois *clusters* usando uma linha de corte de 60%. O *cluster* A é composto por três isolados e o B por 20 isolados. Relativamente aos valores dos índices de diversidade,

$D' = 0,237$ e $J' = 0,241$ (índices de diversidade, Tabela suplementar 2), foram muito inferiores aos observados para a amostra da queijaria A3 de 2016, demonstrando menor diversidade de isolados e supremacia de uma estirpe relativamente à outra. Analisando os dados da metagenômica também se observou diferença nas abundâncias relativas deste género entre a amostra da queijaria A3 de 2016 e da queijaria A4 de 2016, na primeira o valor foi de 70% e na segunda de 45%, contudo é de notar que uma menor abundância relativa não significa menor diversidade.

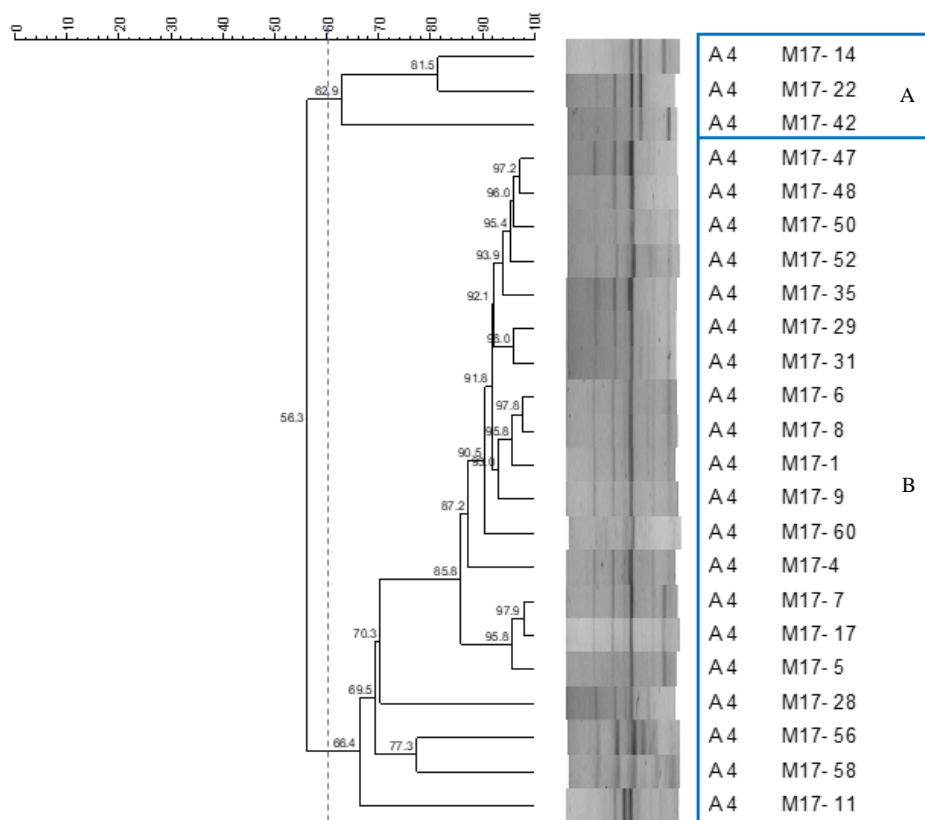


Figura 3.13. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria A4 do ano de 2016. A linha, a azul, a tracejada, representa a linha de corte de 60% para a diferenciação de *clusters* e os retângulos indicam os diferentes *clusters* formados.

Quando se comparou os isolados das amostras dos dois anos observou-se a formação de 13 *clusters* (queijaria A4, Figura suplementar 6), os *clusters* A, B, C, E, F, G e N são compostos cada um por um isolado de 2017, o D por nove isolados de 2017, o H por quatro isolados de 2017, o I por um isolado de 2016 e um isolado de 2017, o J por três isolados de 2016, o L por 15 isolados de 2016 e três isolados de 2017 e o M por três isolados de 2016 e um de 2017. Observou-se uma diversidade muito superior nos isolados de 2017, como também é avaliado pelos índices de diversidade superiores na amostra de 2017 ($D' = 0,850$ e $J' = 0,835$) relativamente à amostra de 2016 ($D' = 0,237$ e $J' = 0,241$) (índices de diversidade, Tabela suplementar 2). As amostras desta queijaria demonstraram, por análise metagenômica, que maiores abundâncias relativas não significa necessariamente maior diversidade, uma vez que a amostra de 2016 apresentou uma abundância deste género de 45% enquanto que no ano de 2017 foi de 25%. Assim esta diversidade está associada aos 20% do total de colónias que foram escolhidos aleatoriamente.

No caso das amostras da queijaria A4, visualizam-se três *clusters* (I, L e M) com isolados dos dois anos e tal como na amostra anterior, a comunidade de *Lactococcus* varia de ano para ano. Contudo haverá sempre estirpes presentes em todas as amostras, que provavelmente poderão ter um papel relevante no fabrico e maturação do próprio queijo. Para confirmar esta conclusão deveriam ser realizados mais estudos para determinar o potencial deste grupo de *Lactococcus*.

Relativamente ao ano de 2017, uma das amostras que apresentou maior diversidade de perfis foi a amostra da queijaria A3. Como esta amostra já foi analisada em conjunto com a amostra da mesma queijaria mas do ano de 2016, escolhemos analisar, em maior detalhe, a amostra da queijaria A1 (Figura 3.14), por também apresentar elevada diversidade de perfis. Ao analisar a amostra da queijaria A1 de 2017, observaram-se sete *clusters*, sendo os *clusters* A, B, D, E e G compostos por um isolado cada, o C por 16 isolados e o F por dois isolados. Desta forma, poderá haver dominância de uma estirpe de *Lactococcus*, uma vez que a maioria dos isolados possui perfil com elevado nível de semelhança, o que é revelado pelos valores dos índices de diversidade $D'=0,541$ e $J'=0,436$ (índices de diversidade, Tabela suplementar 2). Estes valores comprovam que a diversidade deste género é baixa, sendo que escolhendo um isolado aleatoriamente a probabilidade de ele pertencer a uma espécie diferente é de cerca de 50%.

Quando são analisadas as amostras da mesma queijaria dos dois anos de produção (queijaria A1, Figura suplementar 7), observou-se que os isolados organizaram-se em dez *clusters*, sendo o A, o B, o F, o G e o H compostos por um isolado de 2017 cada, o C por 18 isolados de 2017 e por 11 isolados de 2016, o D por sete isolados de 2016, o E por dois isolados de 2017, o I por três isolados de 2016 e o J por seis isolados de 2016. Foi possível observar que houve maior número de perfis observados no ano de 2017 do que em 2016. Quando analisados os índices de diversidade são superiores no ano de 2016 ($D'=0,732$ e $J'=0,934$) relativamente ao ano de 2017 ($D'=0,541$ e $J'=0,436$) (índices de diversidade, Tabela suplementar 2). Estes valores estão associados ao facto de que na amostra de 2016 existe um grande número de isolados com o mesmo perfil enquanto que no ano de 2017, os isolados estão divididos em quatro *clusters* cada um com número relativamente semelhante de isolados.

Tendo em conta as abundâncias relativas calculadas pela análise metagenómica os valores entre as duas amostras são semelhantes, sendo que no ano de 2016 foi de cerca de 30% e em 2017, 35%. O perfil dominante observado na análise realizada só com a amostra de 2017 é também visualizado num grande número de isolados da amostra do ano de 2016. Por sua vez, existe a hipótese de que o perfil corresponda a uma estirpe de *Lactococcus* dominante nas amostras desta queijaria e que esteja sempre presente ao longo dos anos de produção, possuindo influência nas características do próprio queijo.

A amostra do ano de 2017 que apresentou menor diversidade de perfis foi a amostra da queijaria N10 (Figura 3.15). Observou-se que os isolados apresentavam perfis com elevados níveis de semelhança, estando todos agrupados num único *cluster*.

Considerando os dois anos de produção (queijaria N10, Figura suplementar 8), observou-se que a amostra de 2016 apresentou maior diversidade de perfis do que a amostra de 2017, uma vez que considerando a linha de corte de 60%, os isolados se agruparam em quatro *clusters*, sendo o A composto por 17 isolados de 2016, o B por cinco isolados de 2016, o C por 20 isolados de 2017 e o D por um isolado de 2016. Esta diferença de diversidade de perfis também é observada com o cálculo dos índices de Simpson e de Shannon-Weaver que o ano de 2017 foram ambos nulos e no ano de 2016 foram respetivamente, $D'=0,423$ e $J'=0,629$ (índices de diversidade, Tabela suplementar 2). Neste caso, não foi possível encontrar um perfil comum a ambos os anos de produção, comprovando que a comunidade de *Lactococcus* presentes nas amostras da queijaria N10 varia consoante o ano de produção. Esta variedade também é observada a nível das abundâncias relativas deste género nas diferentes amostras, sendo que na amostra de 2016 o valor foi de 25% e no ano de 2017 de 68%, comprovando mais uma vez que maior abundância do género pode não estar associada diretamente a maior diversidade de estirpes.

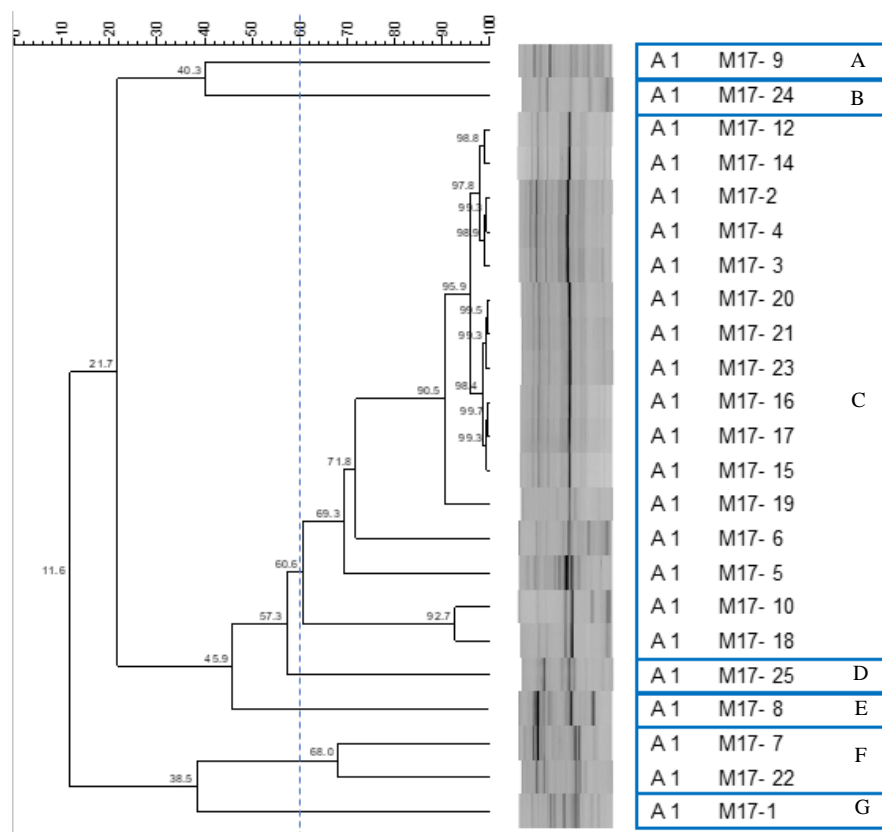


Figura 3.14. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria A1 do ano de 2017.

A linha, a azul, a tracejado, representa a linha de corte de 60% para a diferenciação de *clusters* e os retângulos indicam os diferentes *clusters* formados.

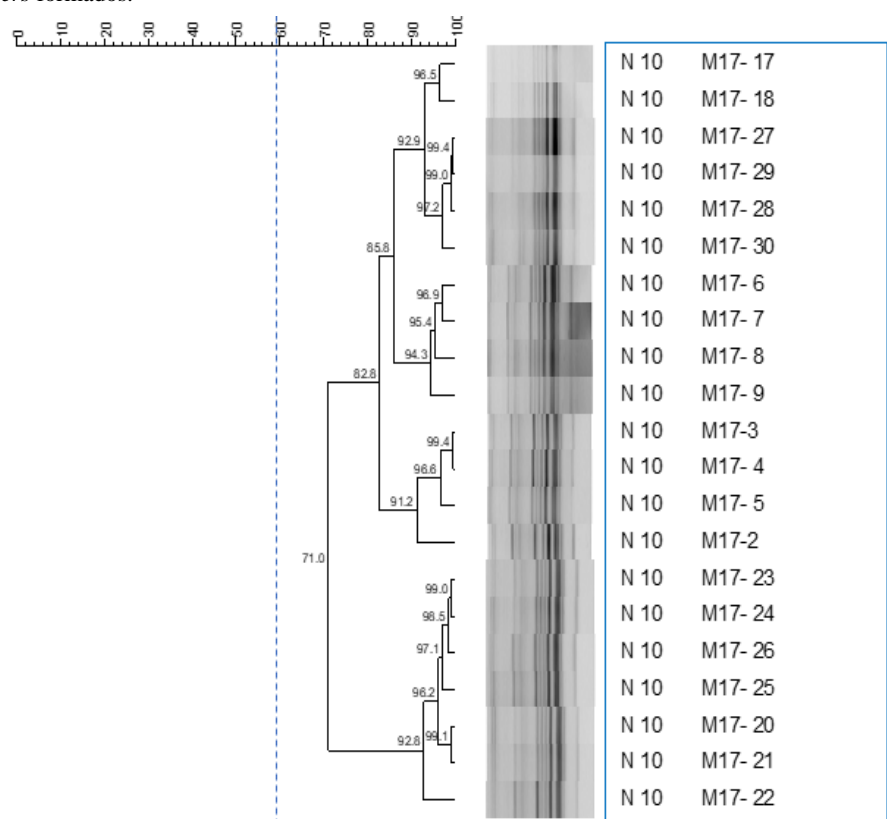


Figura 3.15. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria N10 do ano de 2017.

A linha, a azul, a tracejado, representa a linha de corte de 60% para a diferenciação de *clusters* e os retângulos indicam os diferentes *clusters* formados.

Em 2011, foi realizado um estudo com os queijos Graviera Kritis e Feta em que o objetivo era a diferenciação de isolados do género *Lactococcus* de ambos os queijos. Neste estudo, os autores observaram que no caso do queijo Graviera Kritis os 39 isolados agruparam-se em 29 genótipos e no caso do queijo Feta os 37 isolados agruparam-se em 28 genótipos e provaram que os isolados deste género presentes numa amostra são diferentes dos encontrados em outras amostras de queijos da mesma queijaria. Tal como no presente estudo, concluíram que cada amostra de queijo possui uma comunidade de *Lactococcus* própria da amostra e que esta comunidade influencia o processo de fabrico do próprio queijo e as suas características (Pavlidou *et al.* 2001). Seria interessante para o estudo entender o potencial tecnológico principalmente das estirpes presentes em maior concentração e naquelas que estão presentes em amostras de anos de produção consecutivos.

3.3.2.3. *Enterococcus*

Selecionaram-se os isolados do género *Enterococcus*, também pertencente ao grupo de BAL e analisou-se a diversidade destes em cada amostra. Tal como anteriormente, foram analisadas em detalhe as amostras das queijarias que apresentaram maior e menor diversidade de perfis, em ambos os anos de recolha das amostras.

A amostra do ano de 2016 que apresentou maior diversidade de perfis foi a amostra da queijaria A2 (Figura 3.16) que apresentou dois *clusters* sendo o A composto por 13 isolados e o B por 12 isolados. Calculou-se os índices de diversidade de Simpson, $D' = 0,540$ e de Shannon-Weaver $J' = 0,999$ (índices de diversidade, Tabela suplementar 3), este último valor é muito elevado uma vez que existe igual abundância dos dois perfis, permitindo analisar que nesta amostra existem duas estirpes presentes com igual abundância. Sabendo que a abundância relativa deste género na amostra foi de 1,1%, seria interessante analisar se estas estirpes possuem influência durante o fabrico do queijo como verificado no queijo Beyaz da Turquia (Durlu-Ozkaya *et al.* 2001) ou se serão apenas indicativos da higiene da queijaria.

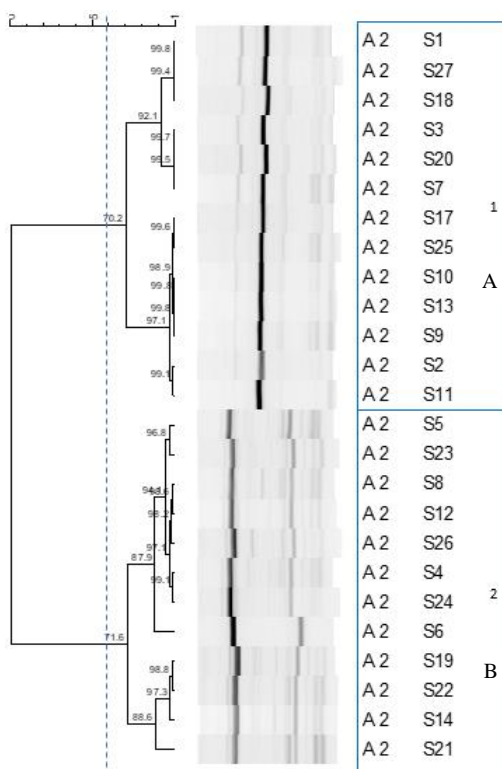


Figura 3.16. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria A2 do ano de 2016.

A linha, a azul, a tracejada, representa a linha de corte de 60% para a diferenciação de *clusters* e os retângulos indicam os diferentes *clusters* formados.

Quando analisados os isolados dos dois anos em simultâneo (queijaria A2, Figura suplementar 9), observa-se a formação de dois *clusters*, o A composto por 12 isolados de 2016 e o B por 13 isolados de 2016 e 24 isolados de 2017. Foi possível observar que no ano de 2017 todos os isolados apresentaram perfis com níveis de semelhança muito elevados entre si e com um conjunto dos isolados de 2016, comprovando que poderá existir uma estirpe do género *Enterococcus* que é predominante e que está presente em todas as amostras desta queijaria independentemente do ano de produção. Pode ser um contaminante recorrente do próprio ambiente da queijaria mas para retirar esta conclusão teriam de ser recolhidas amostras de toda a queijaria e comparar essas estirpes com as presentes nas amostras do queijo, sendo que esta estirpe pode ser característica da própria queijaria.

Uma das amostras de 2016 que apresentou menor diversidade de perfis foi a amostra da queijaria N9, onde os isolados apresentaram todos um perfil único (Figura 3.17). Desta forma, nesta amostra a diversidade deste género foi nula, o que não é um resultado surpreendente uma vez que, quando foi realizada a análise metagenómica desta amostra, este género foi um dos menos abundantes (0,2%) comparativamente com os restantes géneros de BAL.

Nas amostras dos dois anos recolhidas na queijaria N9 (queijaria N9, Figura suplementar 10), observaram-se cinco *clusters* distintos, o A composto por sete isolados de 2017, o B por dez isolados de 2017, o C por 24 isolados de 2016 e um isolado de 2017, o D por cinco isolados de 2017 e o E por dois isolados de 2017. Observou-se que a diversidade de perfis foi muito superior na amostra do ano de 2017 comparativamente com a amostra de 2016 o que foi comprovado pelos valores dos índices de diversidade calculados sendo que no ano de 2016 foram nulos e no ano de 2017 foram $D'=0,747$ e $J'=0,855$ (índices de diversidade, Tabela suplementar 3). Existe um *cluster* composto por isolados dos dois anos, comprovando que a estirpe do género *Enterococcus* predominante na amostra do ano de 2016 também está presente na amostra do ano seguinte mas em abundância muito inferior.

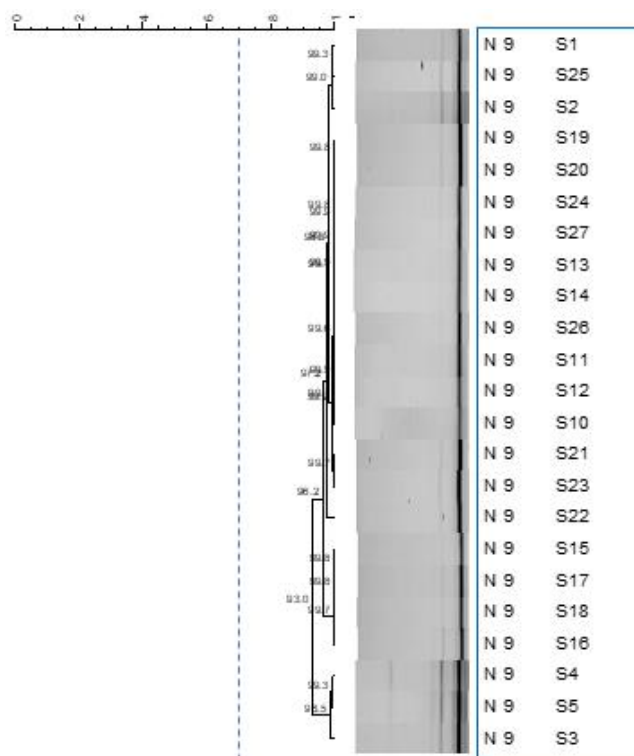


Figura 3.17. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria N9 do ano de 2016.

A linha, a azul, a tracejada, representa a linha de corte de 70% para a diferenciação de *clusters* e os retângulos indicam os diferentes *clusters* formados.

Relativamente às amostras de 2017, a amostra que apresentou maior diversidade de perfis foi a amostra produzida na queijaria A4 (Figura 3.18). Observaram-se seis *clusters*, sendo o A composto por nove isolados, o B por quatro isolados, o C e o D por um isolado cada, o E por três isolados e o F por sete isolados. Sendo que os valores dos índices de diversidade foram $D'=0,780$ e $J'=0,854$ (índices de diversidade, Tabela suplementar 3), comparando apenas o de Simpson é possível analisar que a amostra de 2017 com maior diversidade apresenta um valor superior relativamente à amostra com maior diversidade de 2016, comprovando que tal como aconteceu com BAL e com o género *Lactococcus* foram selecionados para esta análise uma maior diversidade de isolados no ano de 2017. Apesar de que na análise metagenómica os valores das abundâncias foram diferentes entre os dois anos, em 2016 foi 1,8% e em 2017, 0,4%, quando se selecionou os 20% de isolados, aleatoriamente, selecionou-se uma maior diversidade de isolados a partir da amostra de 2017.

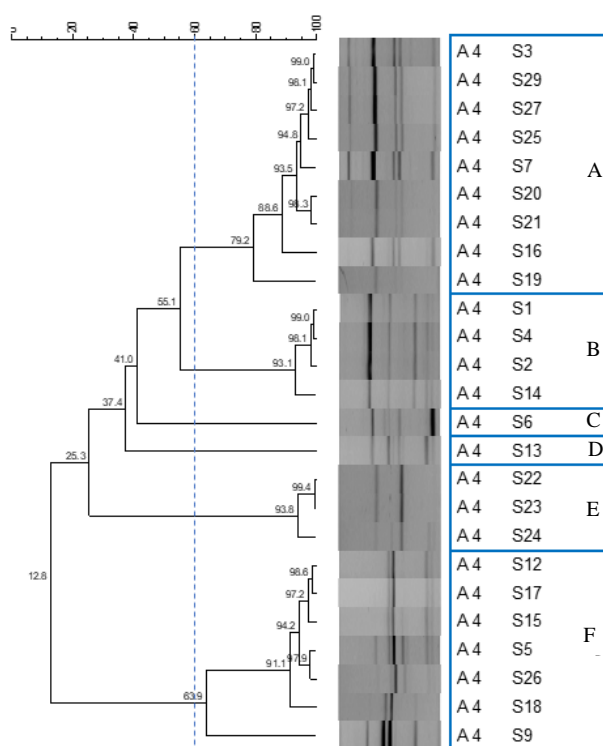


Figura 3.18. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria A4 do ano de 2017.

A linha, a azul, a tracejada, representa a linha de corte de 60% para a diferenciação de *clusters* e os retângulos indicam os diferentes *clusters* formados.

Quando analisados os isolados das amostras dos dois anos (queijaria A4, Figura suplementar 11), observaram-se sete *clusters* sendo o A composto por nove isolados de 2017, o B por quatro isolados de 2017 e um isolado de 2016, o C e o G por um isolado de 2017 cada, o D por três isolados de 2017, o E por 23 isolados de 2016 e um isolado de 2017 e o F por seis isolados de 2017. Visualizou-se novamente que a amostra de 2017 apresentou maior diversidade do que a de 2016, como comprovado nos índices de diversidade de Simpson e de Shannon-Weaver, que no ano de 2016 foram $D'=0,083$ e $J'=0,250$ e em 2017, $D'=0,780$ e $J'=0,854$ (índices de diversidade, Tabela suplementar 3). Nas amostras desta queijaria existem dois perfis que são comuns em ambos os anos, podendo tratar-se de estirpes do género *Enterococcus* sempre presentes nos queijos desta queijaria. Estas duas estirpes poderão possuir um potencial tecnológico e influenciar a maturação do queijo ou um potencial patogénico e serem contaminantes do próprio ambiente da queijaria.

A amostra do ano de 2017 que apresentou menor diversidade foi a amostra da queijaria N10 (Figura 3.19). Observaram-se três *clusters*, o A é composto por 18 isolados, o B por quatro isolados e o C por

três isolados. Os valores dos índices de Simpson e de Shannon-Weaver foram respectivamente $D'=0,460$ e $J'=0,714$ (índices de diversidade, Tabela suplementar 3), valores inferiores aos calculados para a amostra da queijaria A4 de 2017, comprovando a menor diversidade de perfis, contudo continua a existir uma estirpe presente em maior dominância.

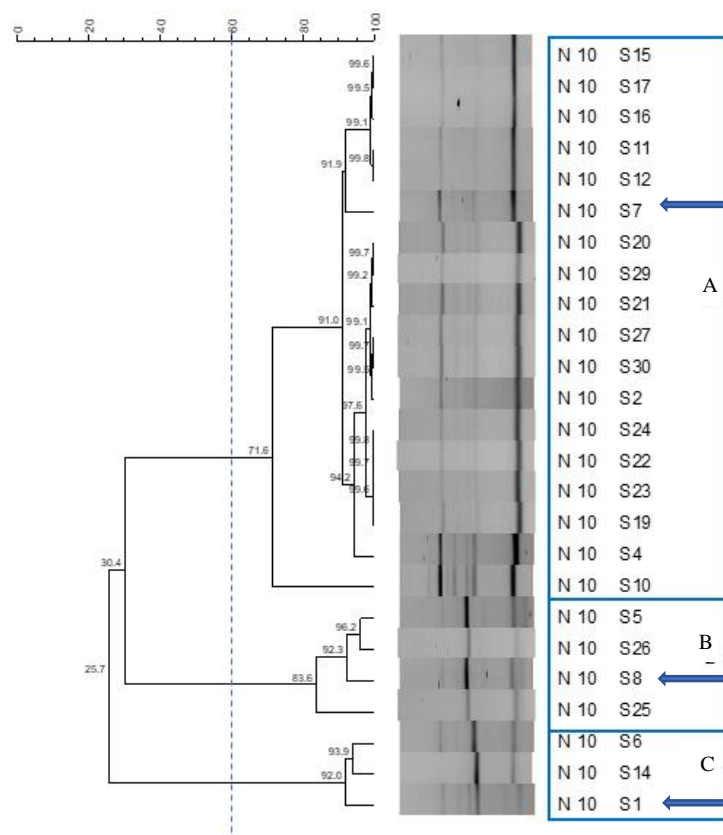


Figura 3.19. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria N10 do ano de 2017.

A linha, a azul, a tracejada, representa a linha de corte de 60% para a diferenciação de *clusters* e os retângulos indicam os diferentes *clusters* formados.

Quando comparados os dois anos em simultâneo (queijaria N10, Figura suplementar 12), observaram-se três *clusters*, o A composto por 27 isolados de 2016 e 18 isolados de 2017, o B por quatro isolados de 2017 e o C por três isolados de 2017. É possível analisar que existe dominância de um perfil, podendo demonstrar que existe uma estirpe de *Enterococcus* que é dominante nas amostras desta queijaria e eventualmente ser característica da própria queijaria e poderia ser usada como referência para todos os queijos desta queijaria mas para isso teriam de ser realizados análises a mais anos de produção.

Um estudo realizado com diversos queijos italianos (Asiago, Montasio, Monte Veronese, Fortina, Mozzarella e Caprino Scamorza) identificou isolados do género *Enterococcus* presentes em todos. A análise dos 124 isolados por SDS-Page para identificação e RAPD para diferenciação revelou que 82 eram da espécie *Enterococcus faecalis*, 27 da espécie *E. faecium*, nove da espécie *E. durans*, quatro da espécie *E. gallinarum* e dois da espécie *E. hirae*. Desta forma foi possível verificar que houve dominância de uma espécie relativamente às restantes (Andrignetto *et al.* 2001). Uma análise que poderia ser realizada no seguimento do presente estudo seria identificar as estirpes que se encontram em maior número e aquelas que se mantêm nas amostras de anos de produção diferentes.

3.3.3. Análise da diversidade microbiana: PFGE

Após a diferenciação dos isolados de todas as amostras das diferentes queijarias e dos diferentes anos de produção com a técnica de RAPD-PCR, selecionaram-se representantes do conjunto de isolados de

BAL, de *Lactococcus* e de *Enterococcus*. De cada amostra, foi selecionado um isolado por *cluster* como representante desse perfil, por exemplo de uma amostra com três *clusters* como a da queijaria N10 do ano de 2017 (Figura 3.19) foram selecionados três isolados assinalados com uma seta azul na Figura: isolado N10 S7, o isolado N10 S8 e o isolado N10 S14. O mesmo procedimento foi realizado para todas as amostras. Esta técnica de PFGE foi escolhida por ser reprodutível, possuir elevado poder discriminante e com o objetivo de selecionar estirpes específicas de cada queijaria e/ou região (ecótipos) e caracterizar genomicamente cada representante.

Em primeiro lugar, selecionaram-se 25 representantes do género *Enterococcus* e procedeu-se ao protocolo de PFGE como descrito no passo 2.3.2.2. Após análise do primeiro gel de eletroforese em campo pulsado, observou-se que em todas as amostras apenas foi visível uma banda de elevada massa molecular (resultado não apresentado) comprovando assim que não ocorreu a restrição por parte da enzima *SmaI* pois o DNA encontrava-se intacto. Das possíveis razões para este resultado duas são a degradação da enzima por resíduos de proteinase K ou temperatura não adequada para o funcionamento da enzima.

De seguida, realizou-se novo protocolo com os mesmos 25 representantes em que no passo de remoção da solução ESP em vez das oito lavagens foram realizadas 12 lavagens, as primeiras quatro foram realizadas em intervalos de 30 min. Após nova eletroforese em campo pulsado, observaram-se os mesmos perfis que anteriormente, descartando desta forma a hipótese de que haveria resíduos de proteinase K a degradar a enzima de restrição. De seguida, testaram-se oito discos dos representantes em estudo e quatro discos analisados em estudos anteriores. Procedeu-se à restrição com a mesma enzima, nas mesmas condições e os tubos foram colocados a incubar a 25°C no bloco seco invés da estufa a 25°C. Os perfis visualizados no gel após eletroforese em campo pulsado já possuíam bandas de diversas massas moleculares, mas com problemas na qualidade do DNA presente nos discos.

Por fim, foram testadas diversas concentrações de enzima de restrição *SmaI* (1 U, 1,25 U e 2 U) e marcas de enzima (NZYTech, Takara e Invitrogen) com o intuito de escolher a concentração e marca ideais para a análise. Após vários testes, observou-se que a enzima da marca Takara na concentração de 2 U foi a que apresentou melhores resultados. Procedeu-se a nova análise de 25 representantes do género *Lactococcus*, onde se aumentou o número de lavagens da solução de ESP e onde no passo de restrição foi usada a enzima *SmaI* da marca Takara na concentração de 2 U e os tubos foram incubados a 25°C no bloco seco. Os resultados são apresentados na Figura 3.20. Como é possível visualizar ocorreu excesso de migração dos perfis. Por motivos de tempo e de material não foram realizadas mais análises com recurso a esta técnica

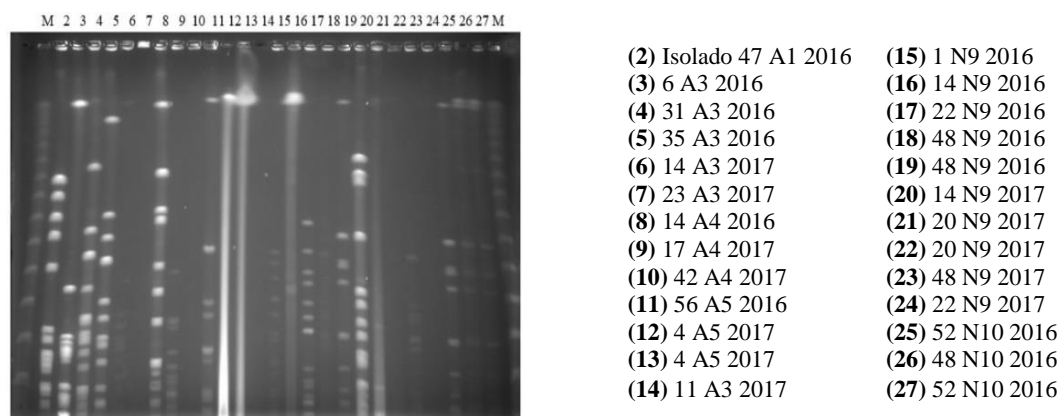


Figura 3.20. Resultados de PFGE com a enzima de restrição *SmaI*. M representa o marcador molecular utilizado Lambda PFG Ladder, New England Biolabs, Inc (NEB).

4. Conclusões

Neste estudo foram analisadas amostras de queijos de cinco queijarias de Azeitão e duas queijarias de Nisa de três anos de produção diferentes (2016, 2017 e 2018). Após análise da diversidade com base na técnica de RAPD-PCR com os *primers* OPC15 e M13 e com o objetivo de caracterizar os perfis microbiológicos de cada amostra, observou-se que apesar das amostras serem de um tipo de queijo, possuem processo de fabrico e matéria prima semelhantes, cada amostra apresentou um perfil de RAPD-PCR característico. Cada amostra tem uma comunidade microbiana muito específica, mesmo amostras da mesma queijaria mas de anos diferentes possuem um microbioma distinto entre si. Esta diversidade na comunidade de cada queijo deve-se ao facto de estes queijos serem produzidos de forma artesanal sem adição de microrganismos por parte do fabricante.

A abordagem metagenómica permitiu obter uma fotografia da diversidade microbiana, ou seja, saber quais os géneros bacterianos presentes nas diferentes amostras e as respetivas abundâncias relativas. Assim observou-se que na maioria das amostras mais de 50% das UTO'S encontradas com a técnica de sequenciação do gene 16S rRNA pertenciam ao grupo das bactérias ácido lácticas sendo que os géneros predominantes foram: *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus*.

Posteriormente, foram usadas duas abordagens para caracterizar os microrganismos autóctones mais especificamente o grupo de bactérias ácido lácticas e dois géneros pertencentes a este grupo: *Lactococcus* e *Enterococcus*. Uma das abordagens relacionada com microbiologia convencional, foi o isolamento dos microrganismos em meios específicos utilizando o meio MRS para isolamento de bactérias ácido lácticas, meio M17 para *Lactococcus* e meio SBA para *Enterococcus*. Esta abordagem permitiu não só selecionar isolados como avaliar a carga microbiana nas amostras, tendo-se observado que o grupo de BAL apresentou valores de contagens na ordem das 10^7 UFC/g, *Lactococcus* na ordem das 10^9 UFC/g e *Enterococcus* na ordem das 10^5 UFC/g.

A segunda abordagem para a caracterização dos microrganismos autóctones foi de microbiologia molecular com a técnica de RAPD-PCR que permitiu agrupar os diferentes isolados em *clusters* do ponto de vista genómico e analisar a diversidade dos isolados em cada amostra e a sua variação em amostras da mesma queijaria mas de anos de produção distintos. Sendo o grupo de BAL um grupo muito diversificado, nas amostras em estudo isso não se observou pois a diversidade deste grupo foi reduzida na maioria das amostras, as condições de isolamento poderão ter favorecido determinadas estirpes em detrimento das restantes. Tendo em conta as amostras da mesma queijaria, mas de anos de produção diferentes, observou-se que houve poucos perfis comuns em ambas no caso da análise a BAL e a *Lactococcus*. No caso de *Enterococcus* observou-se a dominância de um perfil demonstrando que é possível que exista uma estirpe que esteja sempre presente em todas as amostras. Concluiu-se mais uma vez que mesmo tendo em conta grupos específicos de microrganismos cada amostra possui uma comunidade microbiana própria única. Assim, com este estudo foi possível diferenciar parte da comunidade microbiana autóctone presente nas amostras de queijos da região de Azeitão e Nisa.

Por fim, passos futuros deste estudo deveriam incluir proceder a nova análise com a técnica de PFGE de isolados dos grupos mencionados anteriormente e seleção de representantes de cada perfil para identificação ao nível de espécie e do seu potencial tecnológico e patogénico de forma a comparar e perceber a dinâmica do microbioma autóctone de cada amostra, percebendo se existem representantes do tipo de queijo ou do próprio ambiente da queijaria.

5. Referências Bibliográficas

- Abdi, R., Sheikh-Zeinoddin, M. and Soleimanian-Zad, S. (2006) Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Iranian Lighvan cheese. *Pakistan Journal of Biological Science*. **9** (1): 99-103.
- Aldrete-Tapia, A., Escobar-Ramírez, M., Tamplin, M. and Hernández-Iturriaga, M. (2014) High-throughput sequencing of microbial communities in Poro cheese, an artisanal Mexican cheese. *Food Microbiology*. **44**: 136-141
- Alegría, A., Delgado, S., Flórez, A. and Mayo, B. (2013) Identification, typing, and functional characterization of *Leuconostoc* spp. strains from traditional, starter-free cheeses. *Dairy Science and Technology*. **93** (6): 657-673
- Andrighetto, C., Knijff, E., Lombardi, A., Torriani, S., Vancanneyt, M., Kersters, K., Swings, J. and Dellaglio, F. (2001) Phenotype and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *Journal of Dairy Research*. **68**: 303-316
- Antonsson, M., Ardo, Y. and Molin, G. (2001) A comparison between the microflora of Herrgård cheese from three different dairies. *International Dairy Journal*. **11**: 285-291
- Aygun, O., Aslantas, O. and Oner, S. (2005) A survey on the microbiological quality of Carra , a traditional Turkish cheese. *Journal of Food Engineering*. **66** (3): 401-404
- Bove, C., Lindrer, J., Lazzi, C., Gatti, M. and Neviani, E. (2011) Evaluation of genetic polymorphic among *Lactobacillus rhamnosus* non-starter Parmigiano Reggiano cheese strains. *International Journal of Food Microbiology*. **144**: 569-572
- Brennan, N., Ward, A., Beresford, T., Fox, P., Goodfellow, M. and Cogan, M. (2002) Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese. *Applied and Environmental Microbiology*. **68** (2): 820-830
- Cabezas, L., Sánchez, I., Poveda, J., Seseña, S. and Palop, M. (2007) Comparison of microflora, chemical and sensory characteristics of artisanal Manchego cheeses from two dairies. *Food Control*. **18** (1): 11-17.
- Caporaso, J., Lauber, C., Walters, W., Berg-Lyons D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J., Smith, G. and Knight, R. (2012) Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal*. **6**: 1621-1624.
- Chombo-Morales, P., Kirchmayr, M., Gschaedler, A., Lugo-Cervantes, E. and Villanueva- Rodriguez, S. (2016) Effects of controlling ripening conditions on the dynamics of the native microbial population of Mexican artisanal Cotija cheese assessed by PCR-DGGE. *LWT- Food Science and Technology*. **65**: 1153-1161
- Cocconcelli, P., Porro, D., Galandini, S. and Senini, L. (1995) Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci. *Letters in Applied Microbiology*. **21**: (376-379)
- Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Urso, R., Cantoni, C. and Comi, G. (2004) Study of the ecology of fresh sausages and characterization of populations of lactic acid bacteria by molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*. **70** (4): 1883-1894
- Codex Standard 283. 1978. Codex general standard for cheese. Codex Alimentarius, FAO/WHO. Rome
- Coppola, R., Nanni, M., Ionizzo, M., Sorrentino, A., Sorrentino, E., Chiavani, C. and Grazia, L. (2000) Microbiological characteristics of Parmigiano Reggiano cheese during the cheesemaking and the first months of the ripening. *Lait*. **80** (5): 479-490
- Cronin, T., Ziino, M., Condurso, C., McSweeney, P., Mills, S., Ross, R. and Stanton, C. (2007) A survey of the microbial and chemical composition of seven semi-ripened Provolone dei Nebrodi Sicilian cheeses. *Journal of Applied Microbiology*. **103** (4): 1128- 1139
- Daniel, P. (1995) Sizing of the *Lactobacillus plantarum* genome and other lactic acid bacteria genome and other lactic acid bacteria species by transverse alternating field electrophoresis. *Current Microbiology*. **30** (4): 243-246
- Delcenserie, V., Taminiau, B., Delhalle, L., Nezer, C., Doyer, P., Crevecœur, S., Roussey, D., Korsak, N. and Daube, G. (2014) Microbiota characterization of a Belgian protected designation of origin cheese, Herve cheese, using metagenomic analysis. *Journal of Dairy Science*. **97** (10): 6046-6056
- Dolci, P., Alessandria, V., Rantsiou, K., Bentolino, M. and Cocolin, L. (2010) Microbial diversity, dynamics and activity throughout manufacturing and ripening of Castelmagno PDO cheese. *International Journal of Food Microbiology*. **143** (1-2): 71-75
- Dolci, P., Alessandria, V., Zeppa, G., Rantsiou, K. and Cocolin, L. (2008) Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: Analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *Food Microbiology*. **25** (2): 392-399
- Domingos-Lopes, M., Stanton, C., Ross, P., Dapkevicius, M. and Silva, C. (2017) Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. *Food Microbiology*. **63**: 178-190.

- Durlu-Ozkaya, F., Xanthopoulos, V., Turail, N. and Litopovlo-Tzanetaki, E. (2001) Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. *Journal of Applied Microbiology*. **91**: 861-870
- Ercolini, D. (2013) High-throughput sequencing and metagenomics: moving forward in the culture- independent analysis of food microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology*. **79** (10): 3148- 3155.
- Feurer, C., Irlinger, F., Spinnler, H., Glaser, P. and Vallaes, T. (2004) Assessment of the rind microbial diversity in a farmhouse-produced vs a pasteurized industrially produced soft red-smear cheese using both cultivation and rDNA-based methods. *Journal of Applied Microbiology*. **97** (3): 546-556
- Fitzsimmons, N., Cogan, T., Condon, S. and Beresford, T. (1999) Phenotypic and genotypic characterization of Non-starter lactic acid bacteria in mature Cheddar cheese. *Applied and Environmental Microbiology*. **65** (8): 3418-3426
- Flórez, A. and Mayo, B. (2006) PCR-DGGE as a tool for characterizing dominant microbial populations in the Spanish blue veined Cabrales cheese. *International Dairy Journal*. **16** (10): 1205-1210
- Foley, S., Lynne, A. and Nayak R. (2009) Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infect Genet Evol*, **9** (4):430-440.
- Forde, B. and O'Toole, P. (2013) Next-generation sequencing technologies and their impact on microbial genomics. *Briefings in Functional Genomics*. **12** (5): 440-453.
- Fox, P., McSweeney, P., Cogan, T. and Guinee, T. (2004) Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. *Elsevier*, London, UK
- Franciosi, E., Settanni, L., Carlin, S., Cavazza, A. and Poznariski, E. (2008) A factory-scale application of secondary adjunct cultures selected from lactic acid bacteria during Puzzone di Moena cheese ripening. *Journal of Dairy Science*. **91** (8): 2981-2991
- Freitas, A., Pais, C., Malcata, X. and Hogg, T. (1996) Microbiological characterization of Picante da Beira Baixa cheese. *Journal of Food Protection*. **59** (2): 155-160
- Freitas, C. and Malcata, X. (2000) Microbiology and biochemistry of cheeses with appellation d'Origine protégée and manufactured in the Iberian Peninsula from ovine and caprine milks. *Journal of Dairy Science*. **83** (3): 584-602.
- Gobbetti, M., Burzigotti, R., Smacchi, E., Corsetti, A. and Angelis, M. (1997) Microbiology and biochemistry of Gorgonzola cheese during ripening. *International Dairy Journal*. **7**: 519-529.
- Gobbetti, M., Folkertsma, B., Fox, P., Corsetti, A., Smacchi, E., Angelis, M., Rossi, J., Kilcawley, K. and Cortini, M. (1999) Microbiology and biochemistry of Fossa (pit) cheese. *International Dairy Journal*. **9** (11): 763-773
- Gosiewski, T. and Brzywczy-Wloch, M. (2015) The use of PFGE method in genotyping of selected bacteria species of the *Lactobacillus* genus. In: Jordan K., Dalmaso M. (eds) *Pulsed Field Gel Electrophoresis*. Methods in Molecular Biology. **1301**. Humana Press, New York, NY.
- Guterres, P. (2013) *Caracterização do queijo de mistura com adição de orégãos*. Tese de mestrado em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar. Escola superior agrária- Instituto politécnico de Castelo Branco, Castelo Branco. 60 pp.
- Hayaloglu, A. and Kirbag, S. (2007) Microbial quality and presence of moulds in Kuflu cheese. *International Journal of Food Microbiology*. **115** (3): 376-380.
- Herreros, M., Fresno, J., Prieto, M. and Tornadijo, M. (2003) Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *International Dairy Journal*. **13**: 469-479.
- Hunter, P. and Gaston, M. (1988) Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*. **26** (11): 2465-2466.
- Ishikawa, M., Kodama, K., Yasuda, H., Okamoto-Kainuma, A., Koizumi, K. and Yamasato, K. (2006) Presence of halophilic and alkaliphilic lactic acid bacteria in various cheeses. *Letters in Applied Microbiology*. **44** (3): 308-313
- Kaur, J., Lee, S., Park, Y. and Sharma, A. (2017) RAPD analysis of *Leuconostoc mesenteroides* strains associated with vegetable and food products from Korea. *LWT- Food Science and Technology*. **77**: 383-388.
- Kongo, J., Ho, A., Malcata, F. and Wedmann, M. (2006) Characterization of dominant lactic acid bacteria isolated from São Jorge cheese, using biochemical and ribotyping methods. *Journal of Applied Microbiology*. **103**: 1838-1844
- Kumar, S., Kanawjia, S. and Kumar, S. (2014) Incorporation of *Lactobacillus* adjuncts culture to improve the quality of Feta-type cheese made using buffalo milk. *Journal of Food Science and Technology*. **52** (8): 5021-5029
- López-Díaz, T., Alonso, C., Román, C., García-López, M. and Moreno, B. (2000) Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. *Food Microbiology*. **17**: 23-32

- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonina, E., Pavlovb, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang K., Goodstein, D., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.-H., Diaz-Muñiz, I., Dosti, B., Smeianov V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson P., Kozyavkin S., Weimer, B. and Mills, D. (2006) Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103** (42), 15611-15616.
- Maoz, A., Mayr, R. and Scherer, S. (2003) Temporal stability and biodiversity of two complex antilisterial cheese-ripening microbial consortia. *Applied and Environmental Microbiology*. **69** (7): 4012-4018
- Martins, A. (2009). *O papel do cardo na tecnologia tradicional de fabrico de queijo- Efeito dos principais fatores tecnológicos*. I, Adrepes. Lisboa
- Martins, M., Freitas, R., Deuvaux, J., Eller, M., Nero, L. and Carvalho, A. (2018) Bacterial diversity of artisanal cheese from the Amazonian region of Brazil during the dry and rainy seasons. *Food Research International*. **108**: 295-300
- Pavlidou, S., Bozoudi, D., Hatzikamari, M., Tzanetakis, N. and Litopoulou-Tzanetaki, E. (2001) Differentiation of lactococci from 2 Greek cheeses with protected designation of origin by phenotypic criteria and RAPD-PCR. *Journal of Food Science*. **76** (3): 175-183
- Pintado, A., Pinho, O., Ferreira, I., Pintado, M., Gomes, A. and Malcata, F. (2007) Microbiological, biochemical and biogenic amine profiles of Terrincho cheese manufactured in several dairy farms. *International Dairy Journal*. **18**: 631-640
- Plaza, M., Rodriguez, A., Palencia, P., Martinez-Cuesta, M., Peláez, C. and Reguena, T. (2006) Discrepancies between the phenotypic and genotypic characterization of *Lactococcus lactis* cheese isolates. *Letters Applied Microbiology*. **43** (6): 637-647.
- Prodromov, K., Thasitou, P., Haritonidou, E., Tzanetakis, N. and Litopoulou-Tzanetaki, E. (2001) Microbiology of "Orinotyri": a ewe's milk cheese from the Greek mountains. *Food Microbiology*. **18**: 319:328
- Produtos tradicionais portugueses [on-line] <http://tradicional.dgadr.pt/pt/>. [Consultado: 15 de março de 2018].
- Psoni, L., Kotzamanidis, C., Yiangou, M., Tzanetakis, N. and Litopoulou-Tzanetaki, E. (2007) Genotypic and phenotypic diversity of *Lactococcus lactis* isolates from Batzos, a Greek PDO raw goat milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*. **114** (2): 211-220
- Randazzo, C., Torriani, S., Akkermans, A., Vos, W. and Vaughan, E. (2002) Diversity, Dynamics and activity of bacterial communities during production of na artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. **68** (4): 1882-1892
- Rantsiou, K., Urso, R., Dolci, P., Comi, G. and Cocolin, L. (2008) Microflora of Feta cheese from four Greek manufacturers. *International Journal of Food Microbiology*. **126**: 36-42
- Rasmussen, M. (2016). Aerococcus: an increasingly acknowledged human pathogen. *Clinical Microbiology and Infection*. **22** (1): 22-27.
- Rattanachakunsopon, P. and Phumkhachorn, P. (2010) Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Scholars Research Library*. **1** (4): 218-228.
- Reis, M. and Malcata, X. (2011) Current state of Portuguese dairy products from ovine and caprine milks. *Small Ruminant Research*. **101**: 122-133.
- Riquelme, C., Camara, S., Dapkevicius, M., Vinuesa, P., Silva, C., Malcata, F. and Rego, O. (2015) Characterization of the bacterial biodiversity in Pico cheese (an artisanal Azorean food). *International Journal of Food Microbiology*. **192**: 86-94.
- Rossetti, L. and Giraffa, G. (2005) Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated RAPD-PCR fingerprint databases. *Journal of Microbiological Methods*. **63**: 135-144.
- Sengül, M. (2006) Microbiological characterization of civil cheese, a traditional Turkish cheese: microbiological quality, isolation and identification of its indigenous Lactobacilli. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. **22**: 613-618
- Settanni, L. and Moschetti, G. (2010) Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*. **27**: 691-697.
- Silva, L., Casella, T., Gomes, E., Nogueira, M., Lindner, J. and Penna, A. (2015) Diversity of lactic acid bacteria isolated from Brazilian water buffalo Mozzarella cheese. *Journal of Food Science*. **80** (2): 411-417
- Smith, C., Klco S. and Cantor, C. (1988). Pulsed-field gel electrophoresis and the technology of large DNA molecules. In: K.E. Davies (Ed.) *Genome analysis: a practical approach* (pp. 41-72). IRL Press. Oxford.

- Soomro, A., Masud, T. and Anwaar, K. (2002) Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health- a review. *Pakistan Journal of Nutrition*. **1** (1): 20-24.
- Tenzic-Vidojevic, A., Vukasinovic, M., Veljovic, K., Ostojic, M. and Topisirovic, L. (2007) Characterization of microflora in homemade semi-hard white Zlata cheese. *International Journal of Food Microbiology*. **114**: 36-42
- Tramer, E. (1969). Bird species diversity: components of Shannon's formula. *Ecology*. **50** (5): 927-929.
- Vieira-Pinto, M., Gadanho, M., Tenreiro, R. and Martins, C. (2008). Evaluation of PCR-based fingerprinting comparatively to the RFLP-PFGE for discrimination of *Salmonella* sp. Isolated from slaughtered pork. *Journal of Food and Drug Analysis*. **16** (1): 88-95.

6. Anexos

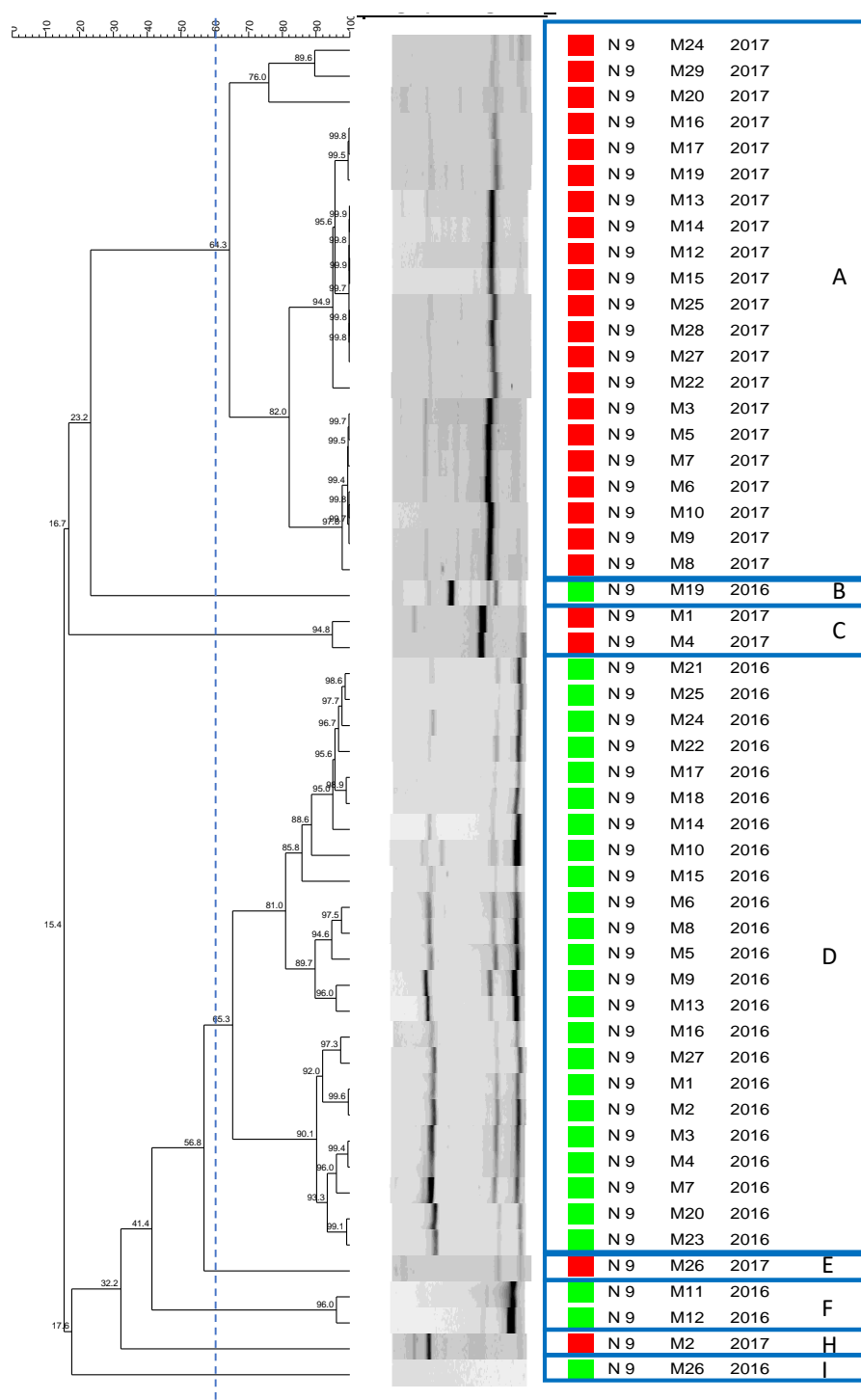


Figura suplementar 1. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria N9 dos anos de 2016 e de 2017. A linha a azul tracejado representa a linha de corte escolhida de 60% para a diferenciação de *clusters* e os retângulos representam os diferentes *clusters* formados.

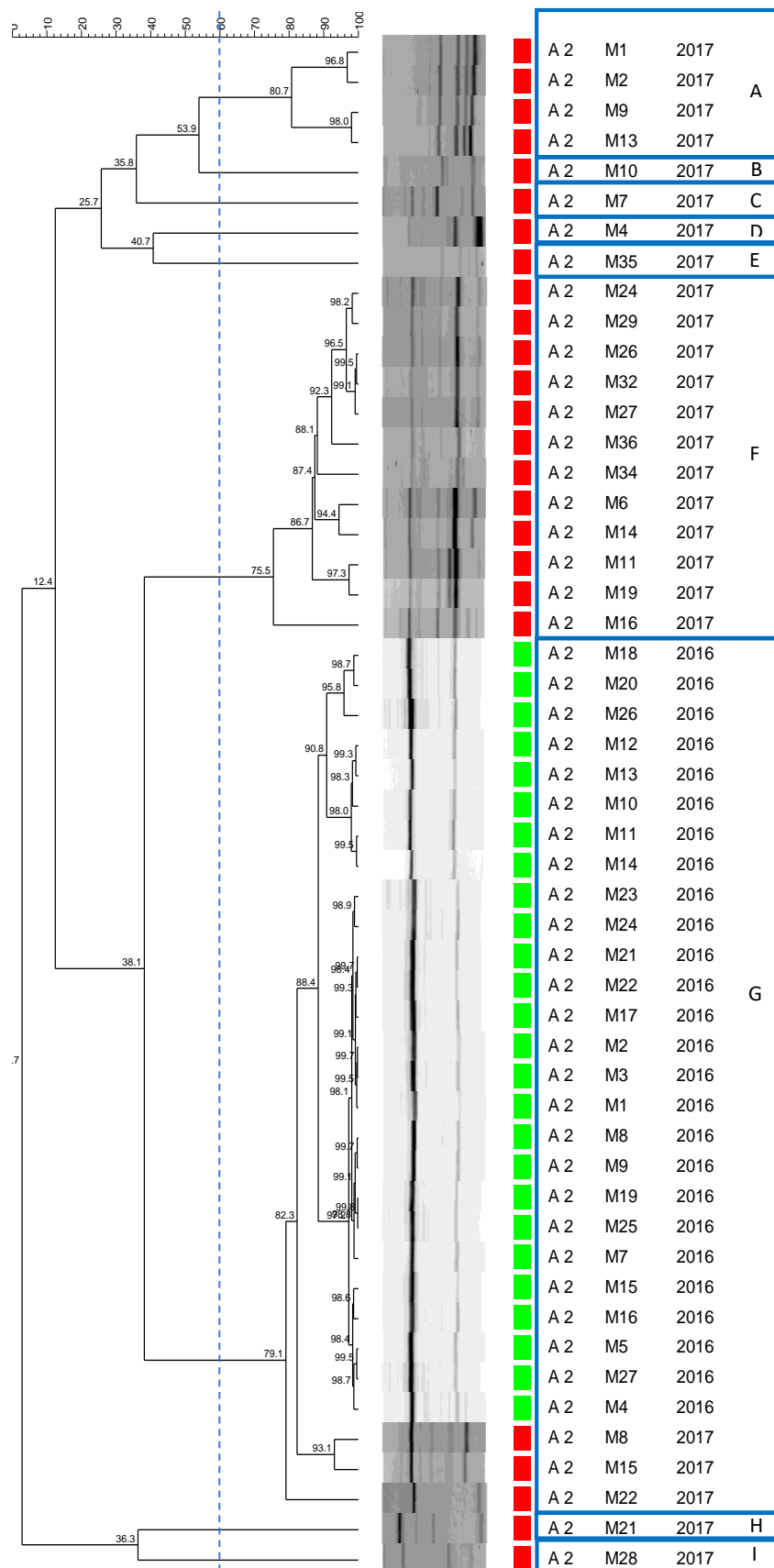


Figura suplementar 2. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria A2 dos anos de 2016 e de 2017. A linha a azul tracejado representa a linha de corte escolhida de 60% para a diferenciação de *clusters* e os retângulos representam os diferentes *clusters* formados.

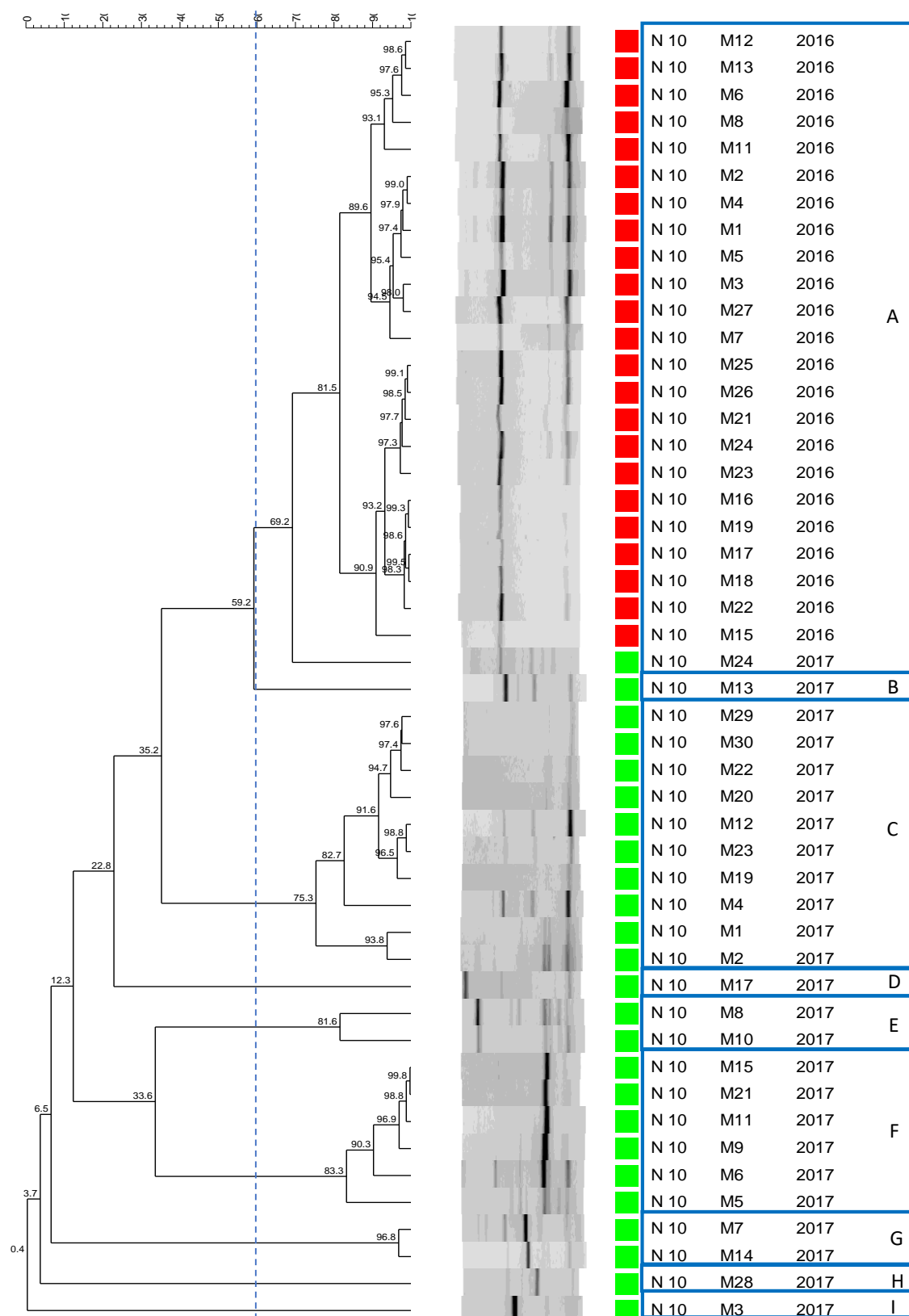


Figura suplementar 3. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria N10 dos anos de 2016 e de 2017.

A linha a azul tracejada representa a linha de corte escolhida de 60% para a diferenciação de *clusters* e os retângulos representam os diferentes *clusters* formados.

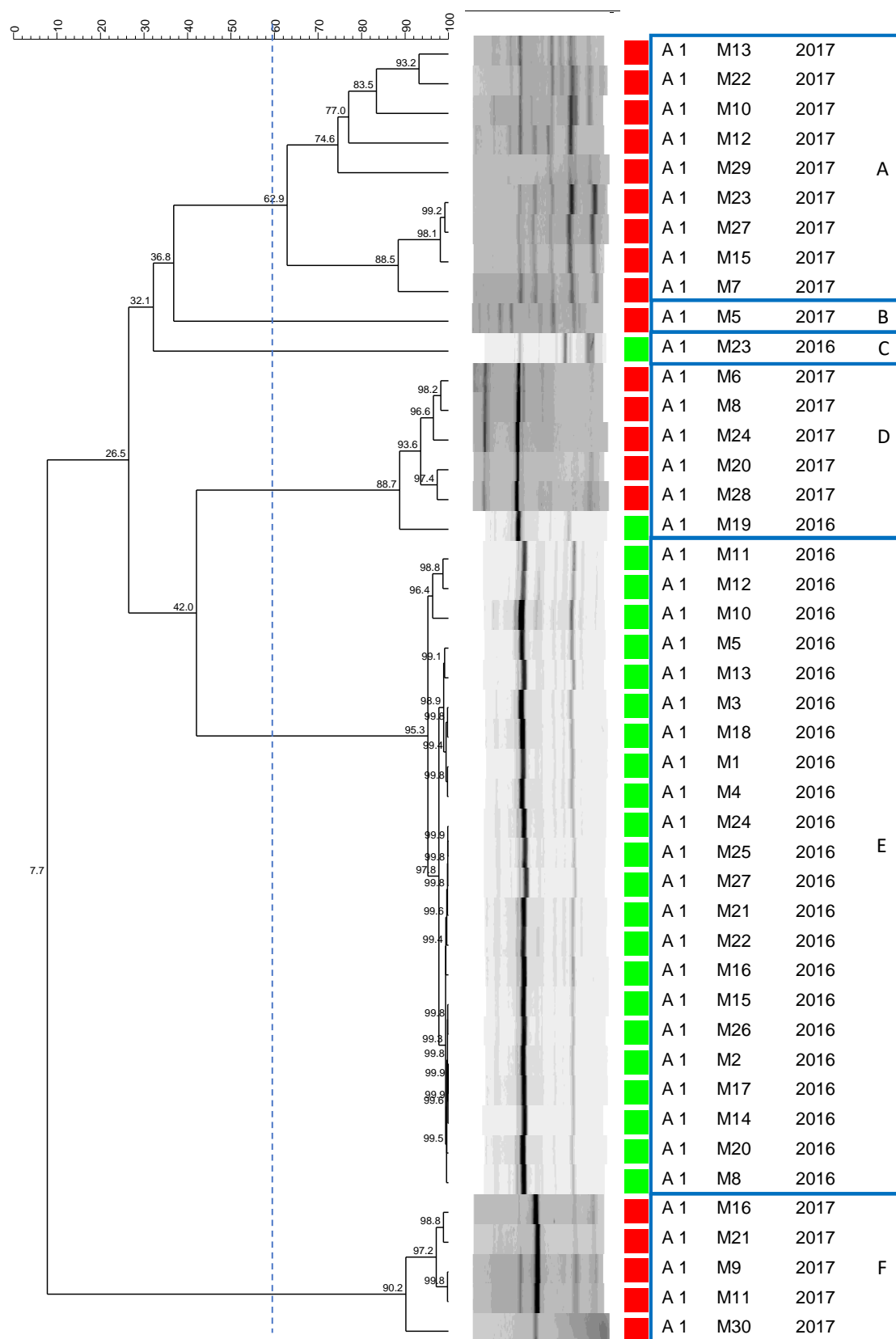


Figura suplementar 4. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria A1 dos anos de 2016 e de 2017. A linha a azul tracejado representa a linha de corte escolhida de 60% para a diferenciação de *clusters* e os retângulos representam os diferentes *clusters* formados.

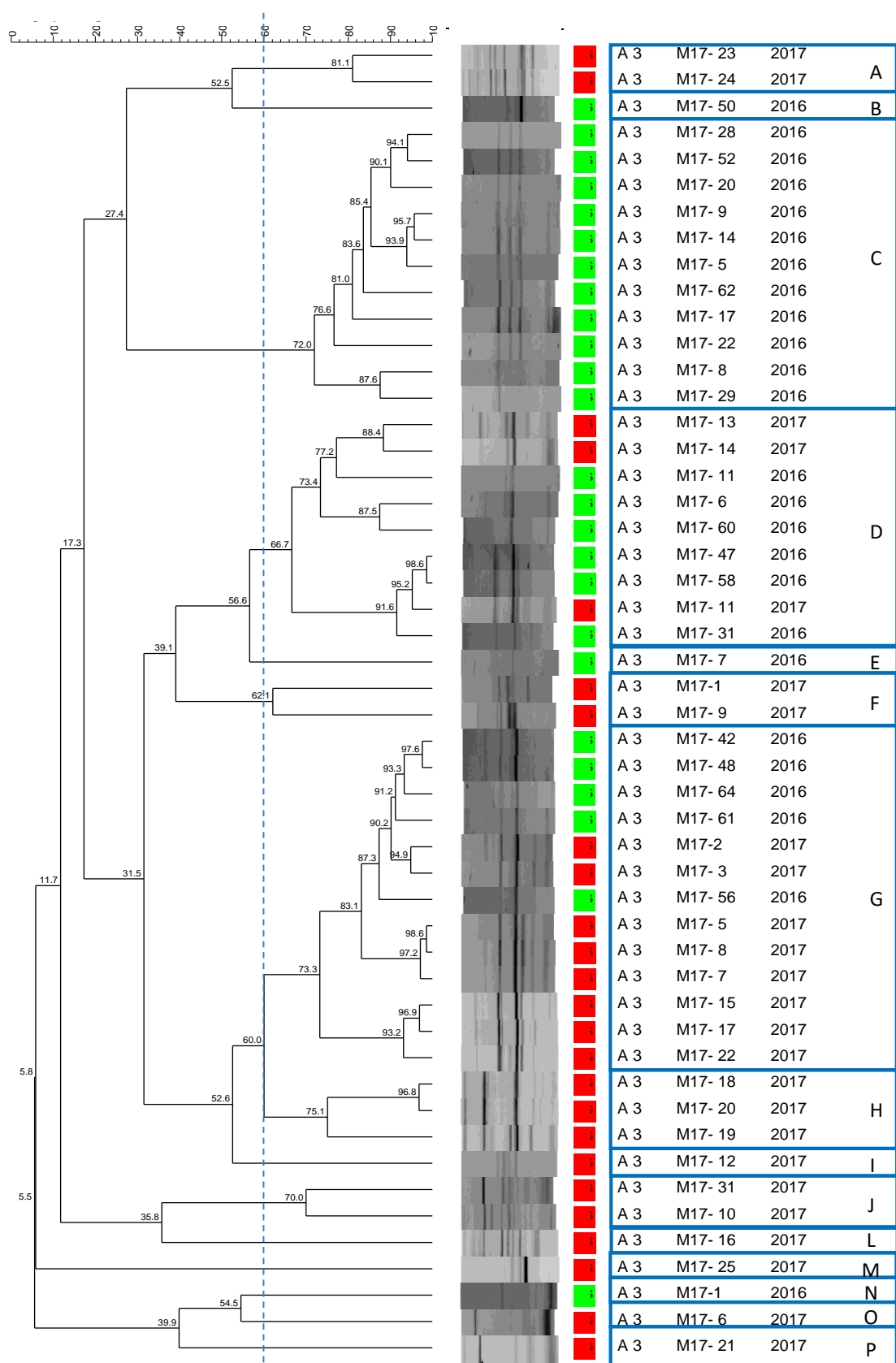


Figura suplementar 5. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria A3 dos anos de 2016 e de 2017. A linha a azul tracejado representa a linha de corte escolhida de 60% para a diferenciação de *clusters* e os retângulos representam os diferentes *clusters* formados

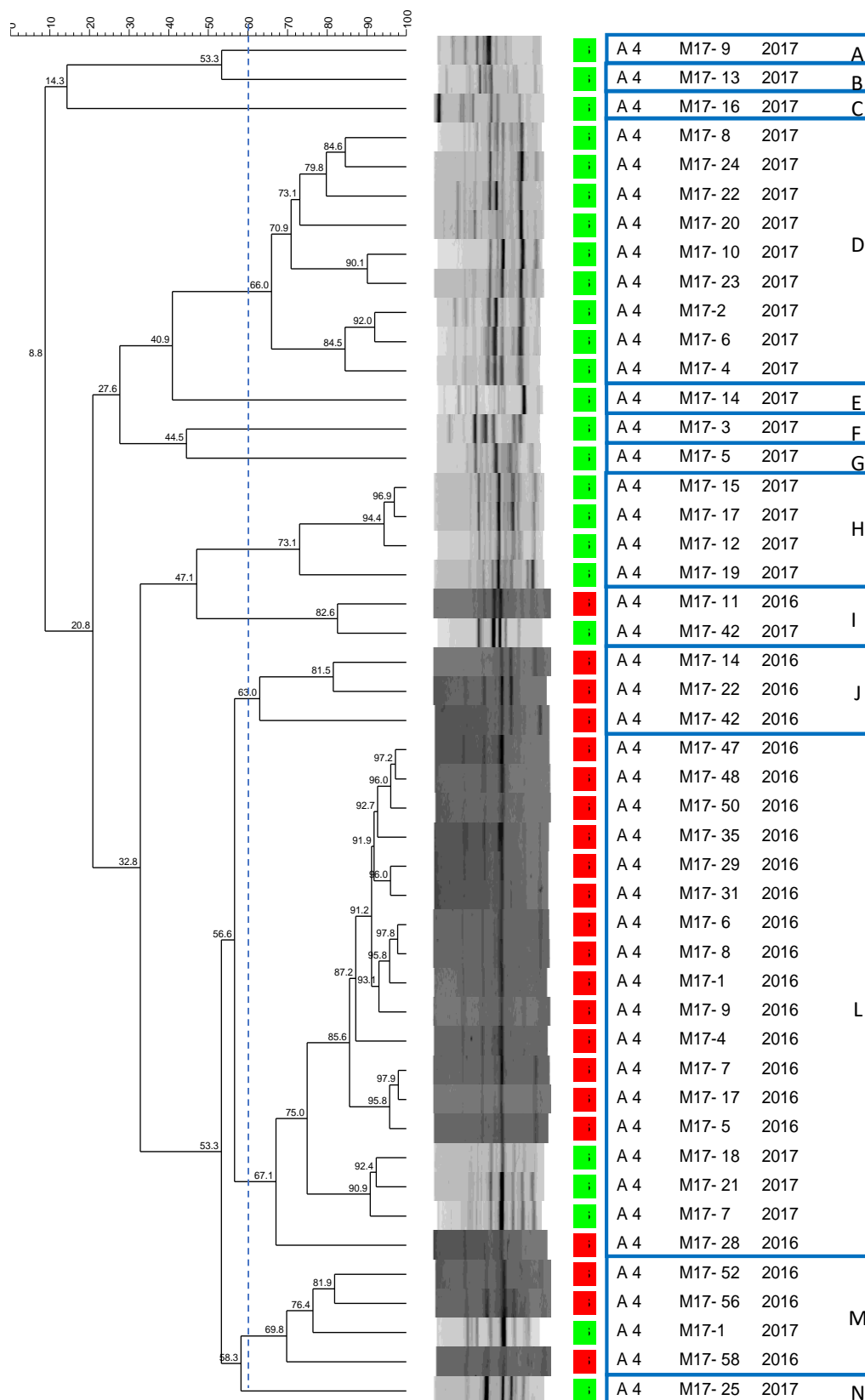


Figura suplementar 6. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria A4 dos anos de 2016 e de 2017. A linha a azul tracejado representa a linha de corte escolhida de 60% para a diferenciação de *clusters* e os retângulos representam os diferentes *clusters* formados

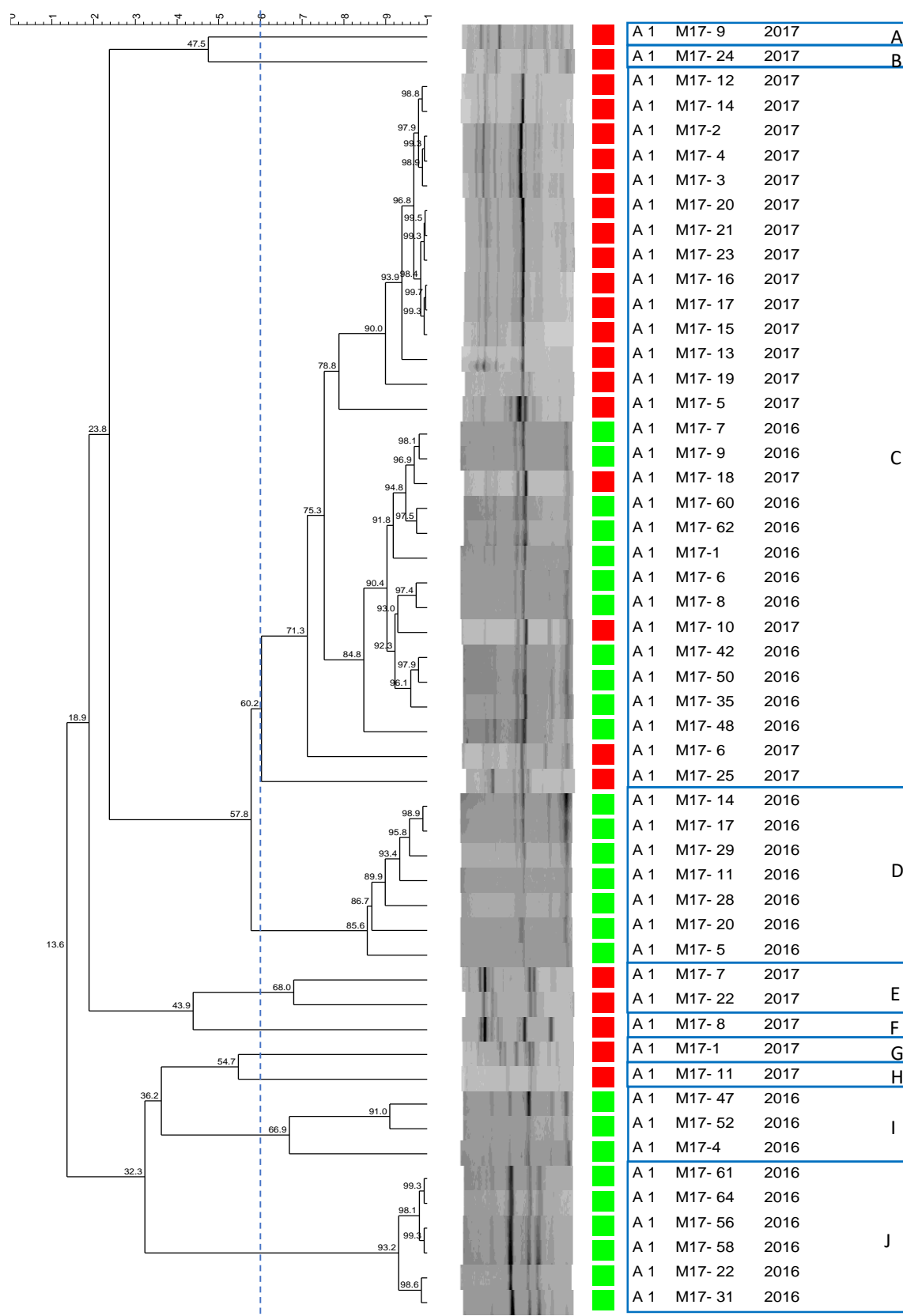


Figura suplementar 7. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria A1 dos anos de 2016 e de 2017. A linha a azul tracejado representa a linha de corte escolhida de 60% para a diferenciação de *clusters* e os retângulos representam os diferentes *clusters* formados

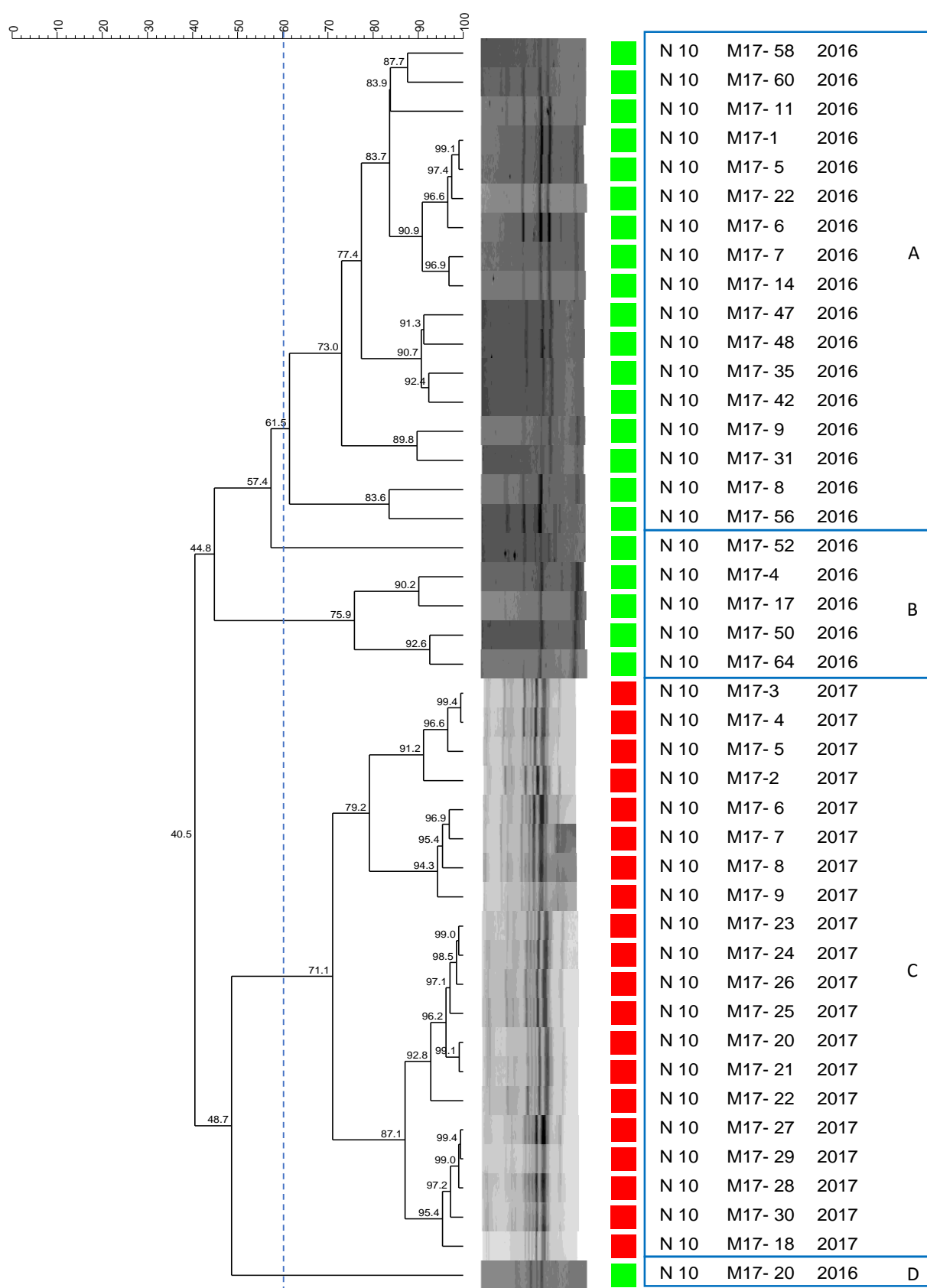


Figura suplementar 8. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria N10 dos anos de 2016 e de 2017. A linha a azul tracejada representa a linha de corte escolhida de 60% para a diferenciação de *clusters* e os retângulos representam os diferentes *clusters* formados

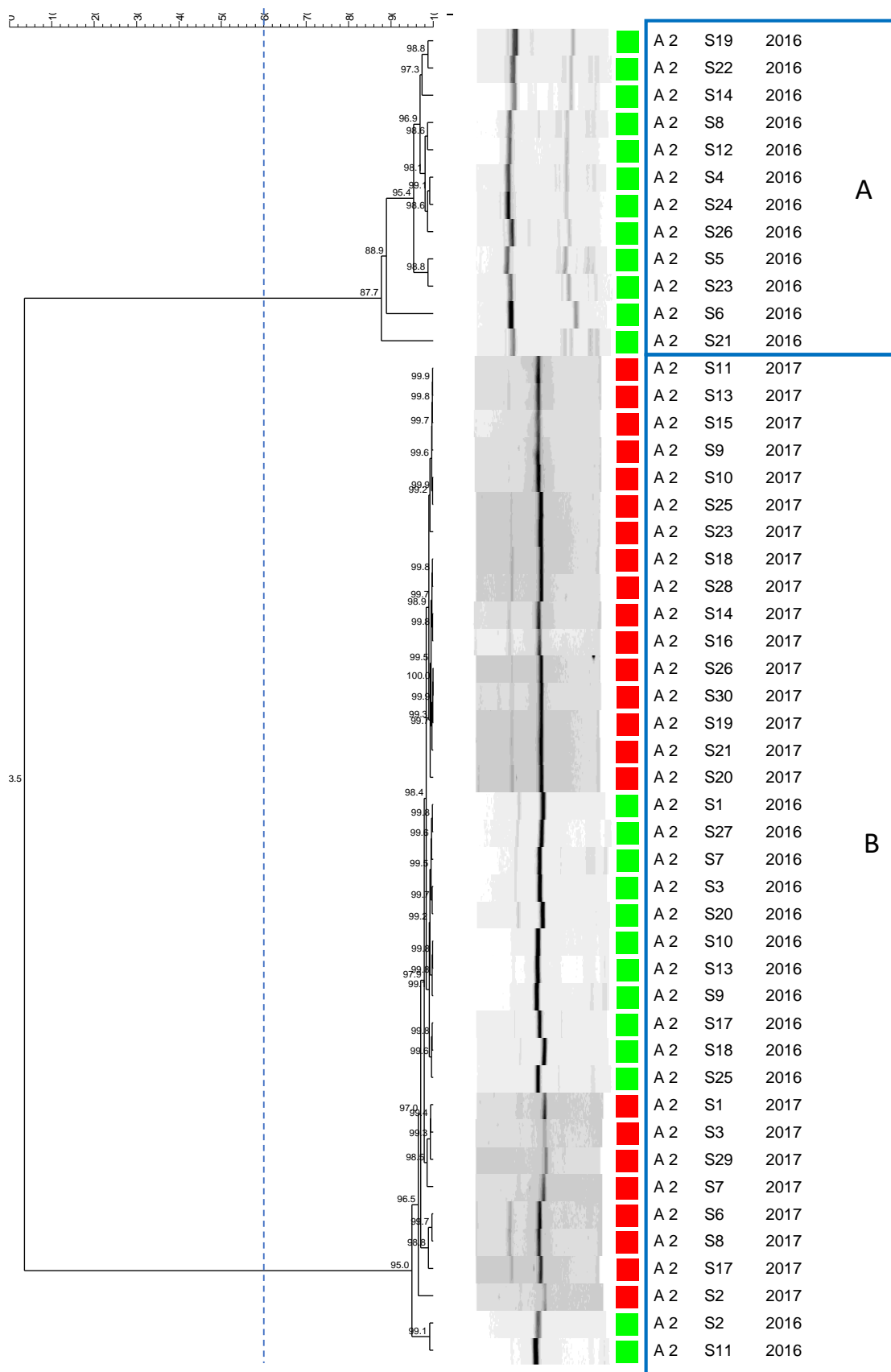


Figura suplementar 9. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria A2 dos anos de 2016 e de 2017. A linha a azul tracejado representa a linha de corte escolhida de 60% para a diferenciação de *clusters* e os retângulos representam os diferentes *clusters* formados

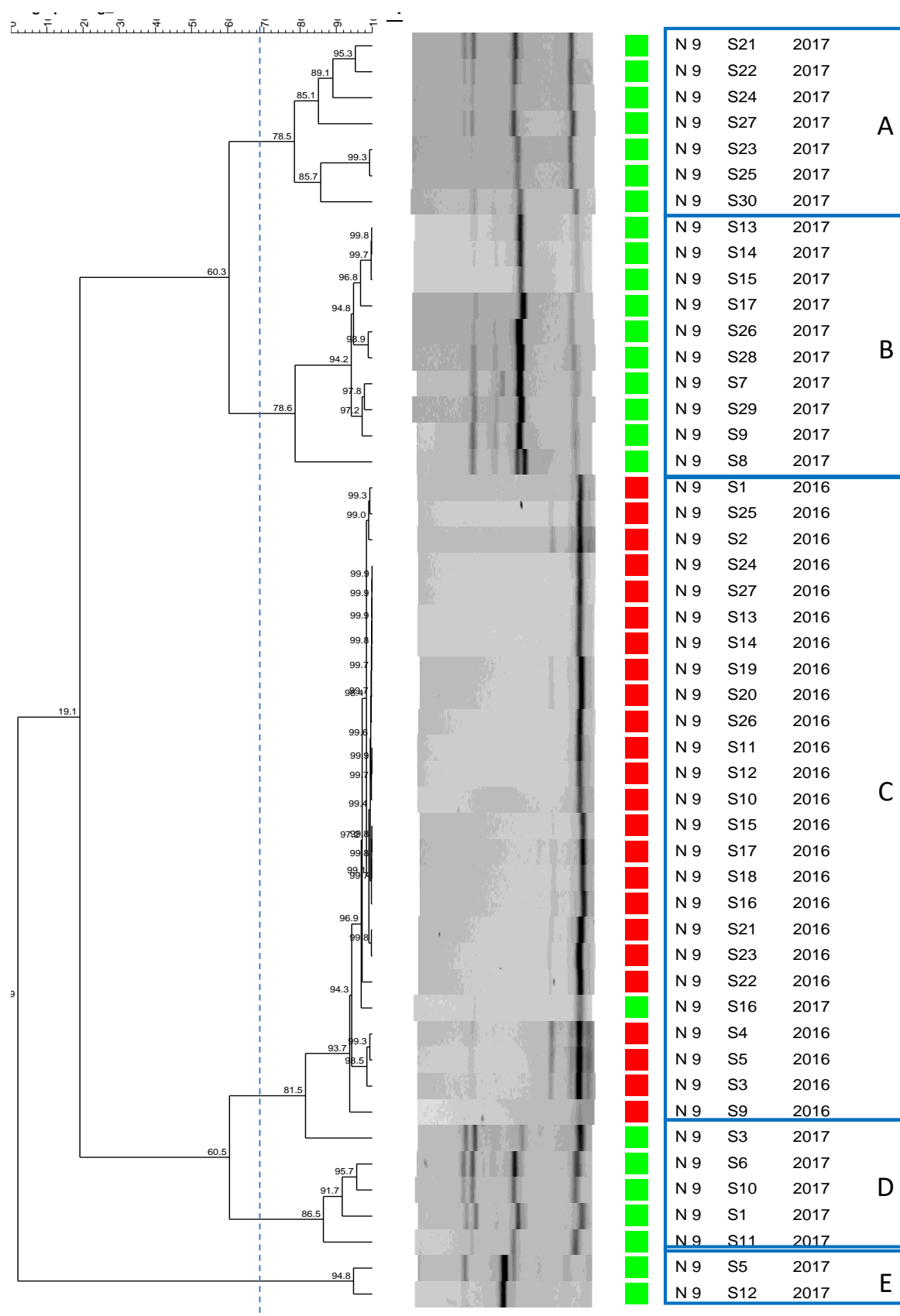


Figura suplementar 10. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria N9 dos anos de 2016 e de 2017. A linha a azul tracejado representa a linha de corte escolhida de 60% para a diferenciação de *clusters* e os retângulos representam os diferentes *clusters* formados

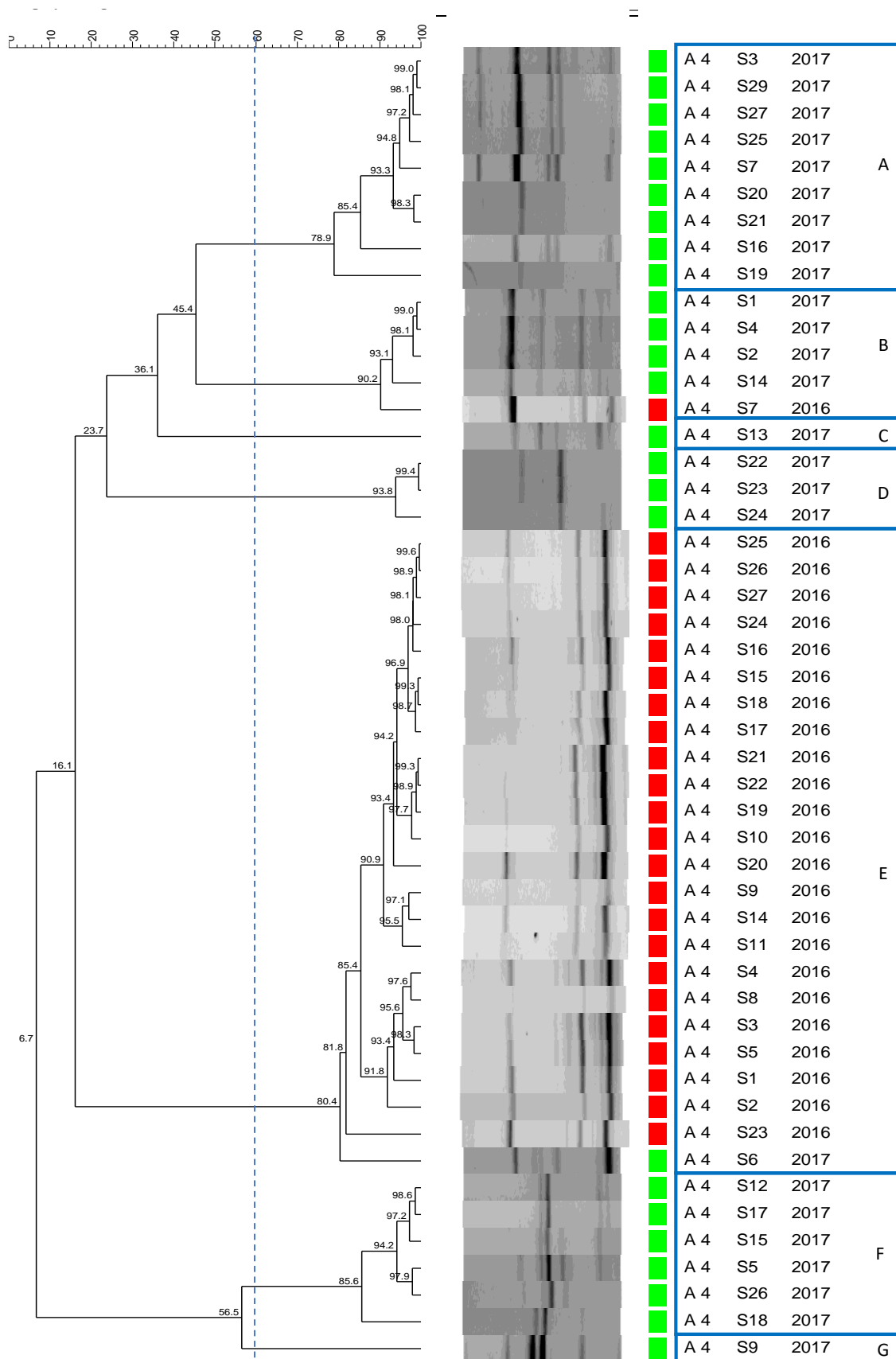


Figura suplementar 11. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria A4 dos anos de 2016 e de 2017.

A linha a azul tracejado representa a linha de corte escolhida de 60% para a diferenciação de *clusters* e os retângulos representam os diferentes *clusters* formados

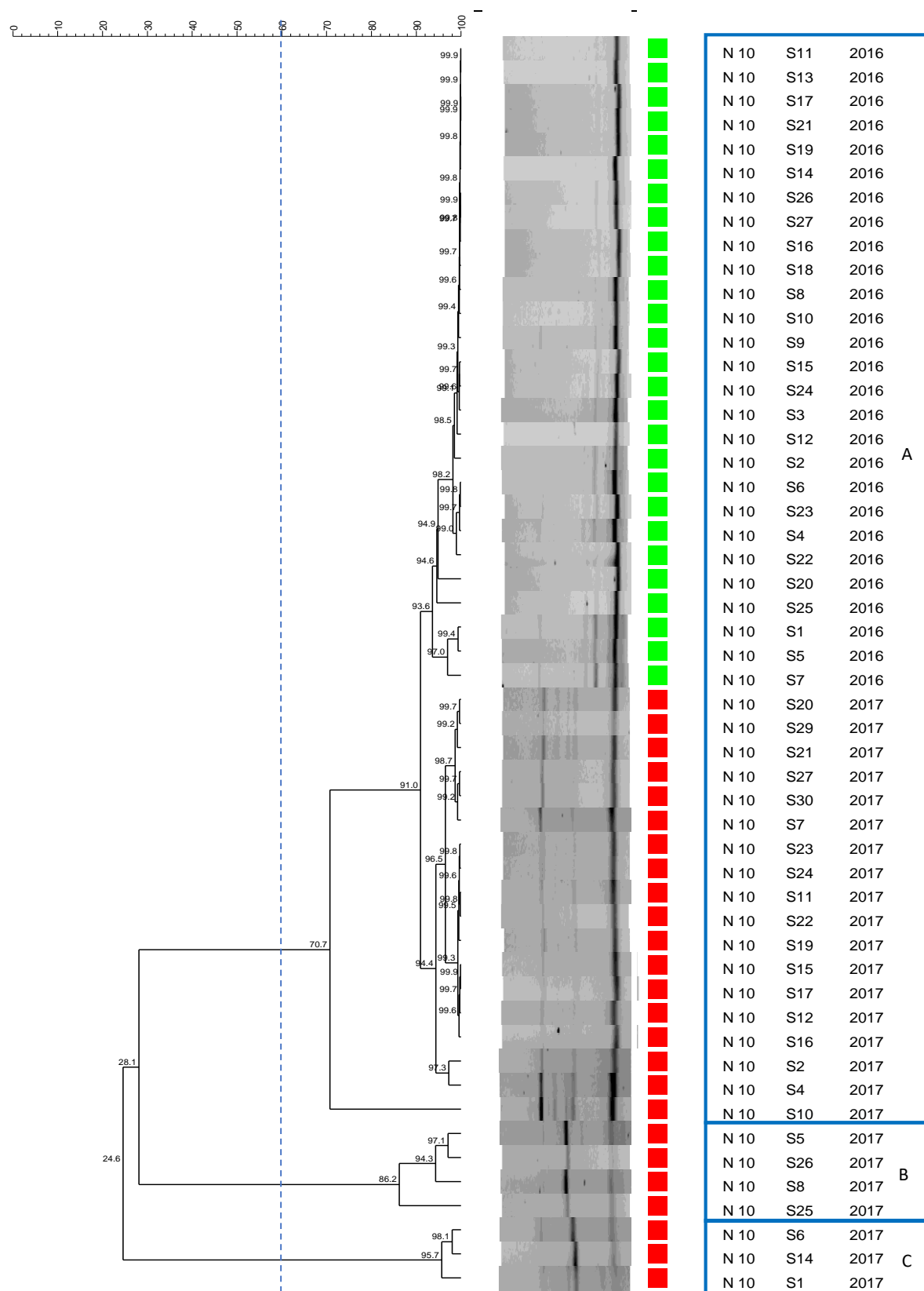


Figura suplementar 12. Dendrograma obtido dos perfis de RAPD-PCR da amostra da queijaria N10 dos anos de 2016 e de 2017.

A linha a azul tracejado representa a linha de corte escolhida de 60% para a diferenciação de *clusters* e os retângulos representam os diferentes *clusters* formados

Tabela suplementar 1. Índices de diversidade de Simpson e de Shannon-Weaver de BAL para as amostras das queijarias A1, A2, N9 e N10.

Amostras	A1 2016	A1 2017	A2 2016	A2 2017	N9 2016	N9 2017	N10 2016	N10 2017
Simpson	0,163	0,696	0,000	0,750	0,218	0,297	0,000	0,793
Shannon-Weaver	0,314	0,738	0,000	0,761	0,392	0,437	0,000	0,800

Tabela suplementar 2. Índices de diversidade de Simpson e de Shannon-Weaver de *Lactococcus* para as amostras das queijarias A1, A3, A4 e N10.

Amostras	A1 2016	A1 2017	A3 2016	A3 2017	A4 2016	A4 2017	N10 2016	N10 2017
Simpson	0,732	0,541	0,704	0,877	0,237	0,850	0,423	0,000
Shannon-Weaver	0,934	0,436	0,801	0,886	0,241	0,835	0,629	0,000

Tabela suplementar 3. Índices de diversidade de Simpson e de Shannon-Weaver de *Enterococcus* para as amostras das queijarias A2, A4, N9 e N10.

Amostras	A2 2016	A2 2017	A4 2016	A4 2017	N9 2016	N9 2017	N10 2016	N10 2017
Simpson	0,540	0,000	0,086	0,780	0,000	0,747	0,000	0,460
Shannon-Weaver	0,999	0,000	0,250	0,854	0,000	0,855	0,000	0,714